

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNG ZUR ROLLE DER PROFILAGGRIN-PEPTIDE  
FLG<sub>91-122</sub> UND FLG<sub>87-197</sub> IN DER KUTANEN ABWEHR**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**DENNIS KARSCH**  
aus Eckernförde

Kiel 2011

1. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Schröder
2. Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Grötzinger
Tag der mündlichen Prüfung:	20.07.2011
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	20.07.2011
gez.	Prof. Dr. Dr. Proksch

Meiner Familie und Johanna

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Haut.....	1
1.1.1. Aufbau der menschlichen Haut.....	1
1.2. Die Immunabwehr der Haut .....	3
1.3. Die Bedeutung antimikrobieller Peptide .....	5
1.4. Der „Epidermale Differenzierungskomplex“ .....	5
1.5. Profilaggrin.....	6
1.6. Fragestellung der Arbeit.....	8
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
2.1. Chemikalien .....	10
2.2. Vektoren .....	10
2.3. Oligonukleotide (Primer) .....	11
2.3.1. Primer für “Nested-PCR” .....	11
2.3.2. Primer für pSUMO3-System .....	11
2.3.3. Vektorprimer für „Colony-Check-PCR“ und Sequenzierungen .....	11
2.4. Enzyme.....	11
2.5. Puffer und Lösungen.....	12
2.6. Nährmedien .....	13
2.7. Einwegmaterial .....	14
2.8. Kits.....	15
2.9. Geräte.....	15
2.10. Mikroorganismen .....	18
2.11. Weitere Materialien .....	18
2.12. Molekularbiologische Methoden.....	18
2.12.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.12.1.1. Design der Primerpaare für die „Nested-PCR“ .....	19

2.12.1.2. Amplifikation der zu klonierenden Sequenzen mittels „Nested-PCR“ .....	20
2.12.1.3. „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung .....	23
2.12.2. Agarose-Gelelektrophorese .....	24
2.12.3. Gel-Extraktion .....	25
2.12.4. Ligation .....	25
2.12.5. Transformation .....	26
2.12.6. Isolierung von Plasmid-DNA .....	28
2.12.7. DNA-Sequenzierung .....	28
2.12.8. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....	28
2.13. Rekombinante Expression von PFLG-3 und PFLG-4 in Escherichia coli .....	29
2.13.1. Struktur des Expressionsvektors .....	29
2.13.2. Durchführung der Expression .....	30
2.13.2.1. Übernachtskulturen .....	30
2.13.2.2. Bestimmung der Bakteriendichte .....	31
2.13.2.3. Induktion und Zellkultivierung .....	31
2.14. Proteolyse der exprimierten Fusionsproteine .....	31
2.15. Chromatographische Aufreinigung von PFLG-3 / PFLG-4 .....	32
2.15.1. Aufreinigung von rekombinantem PFLG-3 / PFLG-4 .....	32
2.15.2. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie .....	33
2.15.3. C8-Umkehrphasen-HPLC .....	33
2.15.4. C4-Umkehrphasen-HPLC .....	34
2.15.5. C2/C18-Umkehrphasen-HPLC .....	34
2.16. Proteinanalytik .....	35
2.16.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	35
2.16.2. Massenspektrometrie .....	36
2.16.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	37
2.17. Antimikrobielle Testverfahren .....	37
2.17.1. Radialer Plattendiffusionstest .....	37

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1. Rekombinante Expression von PFLG-3 und PFLG-4 im pSUMO3-System	40
3.1.1. Amplifizierung der PFLG-3- und PFLG-4-Gensequenzen mittels PCR	40
3.1.2. Expression der Fusionsproteine	43
3.2. Aufreinigung von PFLG-3 und PFLG-4	43
3.3. Antimikrobielle Aktivität von PFLG-3 und PFLG-4 im Radialen Plattendiffusionstest	48
3.3.1. Antimikrobielle Aktivität von PFLG-3	48
3.3.2. Antimikrobielle Aktivität von PFLG-4	50
<b>4. Diskussion</b>	<b>55</b>
4.1. PFLG-3 und PFLG-4 lassen sich in Escherichia coli rekombinant exprimieren	56
4.2. Antimikrobielle Eigenschaften von PFLG-3 und PFLG-4	58
4.3. Mögliche Wirkmechanismen von PFLG-4	61
4.4. Einsatz von PFLG-4 als Therapeutikum	63
4.5. Bedeutung von PFLG-3 und PFLG-4 im Rahmen von Erkrankungen	66
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>71</b>
6.1. Vektorkarte des pSUMO3-Expressionsvektors	71
6.2. Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleinsäuren	71
6.3. Sequenzen	72
6.3.1. cDNA und Proteinsequenz des humanen Profilaggrin	72
6.3.2 Übersicht der rekombinanten Proteinfragmente von Profilaggrin	72
6.3.2.1 PFLG-3	72
6.3.2.2 PFLG-4	73
<b>7. Literatur</b>	<b>74</b>
<b>8. Danksagung</b>	<b>82</b>
<b>9. Lebenslauf</b>	<b>84</b>
<b>10. Erklärung</b>	<b>85</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	“American Type Culture Collection”
AU	Fläche unter der Kurve („area under the curve“)
β	Beta
<i>Bam</i> H	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
bp	Basenpaare
<i>Bsa</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA (“complementary DNA”)
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm / Erdbeschleunigung
h	Stunden
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilobasen
LB	“Lysogenic Broth”
M	molar
MEK	Minimale Effektive Konzentration
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MS	Massenspektrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	„Phosphate-Buffered Saline Solution“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFLG	Profilaggrin
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSB	Tryptic Soy Broth

U	Einheiten ("units")
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid



# 1. Einleitung

## 1.1. Die Haut

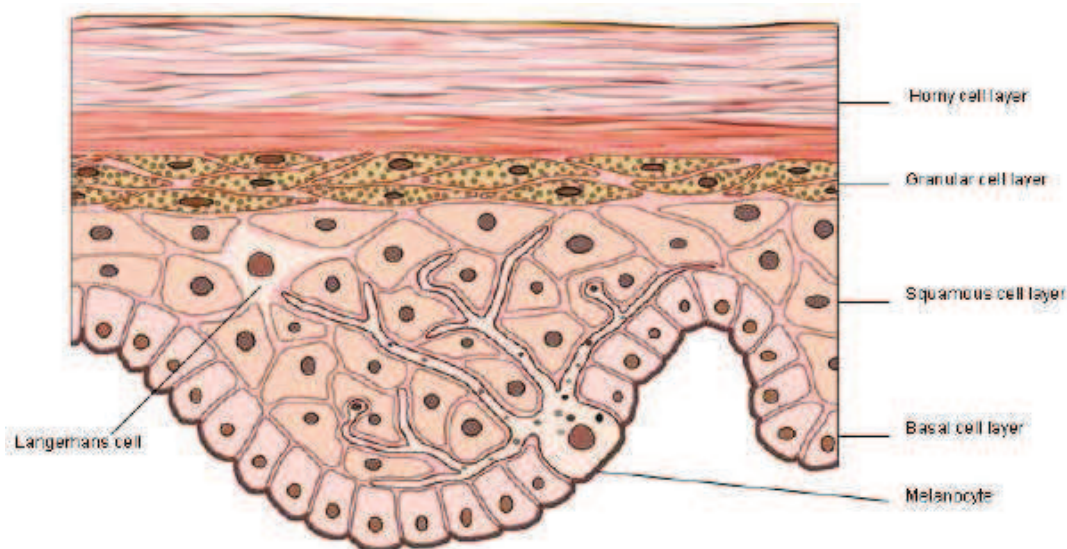
Die Haut bedeckt beim Erwachsenen eine Fläche von etwa 2 m<sup>2</sup> und ist damit eines der größten Organe des menschlichen Körpers (Alonso und Fuchs, 2003). Sie stellt die Abgrenzung des Körperinneren von der Umwelt dar, ermöglicht aber gleichzeitig den Kontakt zur Umgebung. Weiterhin übernimmt die Haut vielfältige Aufgaben im Rahmen der Homöostase. So bietet die Epidermis als äußere Bedeckung des Körpers einen wirksamen physikalischen und chemischen Schutz vor zahlreichen schädigenden Einflüssen der Außenwelt. Zugleich schützt die Haut vor übermäßigem Wasserverlust und ist aufgrund der Gefäßarchitektur und ihrer Schweißdrüsen an der Thermoregulation beteiligt (Lüllmann-Rauch, 2003). Da in der Haut zahlreiche Rezeptoren der somatoviszeralen Sensibilität (Ruffini-Körperchen, Meissner-Tastkörperchen, Vater-Pacini-Körperchen, etc.) lokalisiert sind, können verschiedenste Reize aus der Umwelt (Tastsinn, Druck, Vibration, Schmerz, Temperatur) wahrgenommen werden. Über die Haut erfolgt zudem ein Teil der Kommunikation; so zum Beispiel beim Erröten oder Erblassen (Leonhardt, 1990) oder durch die Abgabe von Geruchsstoffen, den Pheromonen. Im Zusammenhang mit der angeborenen Immunität und der Verbindung von angeborener und adaptiver Immunabwehr spielt die Haut ebenfalls eine bedeutende Rolle. Der Haut als mechanischer und chemischer Schutzmantel, Regulator des Wasserhaushaltes und der Körpertemperatur sowie sensorisches und exkretorisches Organ kommt damit eine essentielle Bedeutung bei der Anpassung an das terrestrische Leben zu (Harding, 2004; Elias, 2005; Elias, 2008).

### 1.1.1. Aufbau der menschlichen Haut

Die Hautdecke des Menschen wird in die Haut (Cutis) und die Unterhaut (Subcutis) eingeteilt, wobei sich die Cutis wiederum in die Lederhaut (Dermis) und Oberhaut (Epidermis) gliedern lässt, die durch eine Basallamina voneinander getrennt sind. Die Differenzierung der Haut erfolgt aus dem äußeren (Ektoderm) und dem mittleren Keimblatt (Mesoderm; Sadler, 2004). Aus dem Ektoderm entwickeln sich vorwiegend die epithelialen Strukturen der Haut (Epidermis, Haare, Nägel). Die Dermis mit ihren Gefäßen entsteht aus dem Mesoderm (Sadler, 2004).

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Epithel, das vor allem aus Keratinozyten besteht. Hier finden sich zudem Pigment-bildende Melanozyten, Merkel-Zellen

(Oberflächensensibilität) und dem Immunsystem zugehörige Langerhans-Zellen. Die Epidermis lässt sich histologisch in vier Schichten gliedern: das *Stratum basale*, das *Stratum spinosum*, das *Stratum granulosum* und das *Stratum corneum* (siehe Abb. 1.1.). Das Stratum basale wird von einer Lage prismatischer Zellen gebildet, die direkt der Basallamina aufsitzen und als Stammzellen fungieren, aus denen durch mitotische Teilungen die Keratinozyten hervorgehen. Mitosen finden in der gesunden Epidermis hauptsächlich hier statt. Von dieser Schicht aus erfolgt dann eine permanente Zellwanderung von basal nach superfizial. Die darüber liegende Schicht stellt das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) dar. Hier finden sich zwei bis fünf Lagen größerer polygonaler Zellen, die im histologischen Präparat in Folge artifizieller Schrumpfung ihre Desmosomen-Kontakte besonders deutlich erkennen lassen (daher „Stachelzellschicht“). Das *Stratum granulosum* (Körnerschicht) enthält circa drei Zellschichten, welche die charakteristischen Keratohyalin granula tragen. Diese spiegeln den in der Epidermis von basal nach superfizial zunehmenden Verhornungsprozess wider. Weiterhin kommt es in dieser Schicht zu einem Verlust der Zellorganellen und der metabolischen Aktivität. Die abschließende Schicht bildet das *Stratum corneum* (Hornschicht). Diese Schicht wird in der sich im Bereich der Handinnenflächen und der Fußsohlen befindlichen Leistenhaut von bis zu 100 Zellschichten, in der den übrigen Körper bedeckenden Felderhaut von etwa 25 Zellschichten, gebildet. Die Zellen sind hier abgestorben (Lüllmann-Rauch, 2003). Diese sogenannten Korneozyten werden durch den „Cornified Cell Envelope“ (einer verhornten Zellhülle), die lipidreiche extrazelluläre Matrix sowie Korneodesmosomen zusammengehalten („brick and mortar“-Modell, Nemes und Steinert, 1999). Unter gesetzmäßiger Veränderung ihrer Struktur durchwandern die Keratinozyten demnach die Epidermis. Dieser Prozess wird als terminale Differenzierung bezeichnet und dauert zwei bis vier Wochen (Graumann und Sasse, 2005). Im Rahmen dieser Differenzierung erfolgt eine verstärkte Expression verschiedener Proteine. Eine Vielzahl dieser Proteine wird dem „Epidermalen Differenzierungskomplex“ (siehe 1.4.) zugeordnet.



**Abb. 1.1.: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Epidermis.** Die menschliche Epidermis lässt sich in folgende vier Schichten gliedern: *Stratum basale* („Basal cell layer“), *Stratum spinosum* („Squamous cell layer“), *Stratum granulare* („Granular cell layer“) und *Stratum corneum* („Horny cell layer“). Neben den Keratinozyten sind die zum Immunsystem gehörigen Langerhans-Zellen („Langerhans cell“) und die Pigment-bildenden Melanozyten („Melanocyte“) gezeigt (Quelle: <http://www.dermnetnz.org/doctors/principles/images/epidermis.jpg>).

Als Dermis wird das unter der Epidermis liegende Gewebe bezeichnet, das sich in der Tiefe bis zum subkutanen Fettgewebe ausdehnt. Es findet sich hier elastisches Bindegewebe, das in besonderem Maße für die mechanische Widerstandsfähigkeit der Haut verantwortlich ist. Die Dermis führt zudem die terminalen Blutgefäße sowie Nerven. Die Hauptkomponenten sind Fibroblasten, Mastzellen, Meissner-Tastkörperchen und weitere Gewebszellen, die in eine Grundsubstanz aus Proteoglykanen eingebettet sind (Lüllmann-Rauch, 2003).

Die Subcutis besteht aus lockerem Binde- sowie Fettgewebe, in das die epifaszialen Leitungsbahnen eingebettet sind. In den verschiedenen Körperregionen finden sich unterschiedlich große Anteile des Fettgewebes, um hier als Energiespeicher und Wärmeisolator sowie als Druckpolster (z.B. Fußsohle) zu fungieren.

## 1.2. Die Immunabwehr der Haut

Die menschliche Haut wird als große Kontaktfläche zur Umwelt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilzen konfrontiert. Dennoch kommt es bei gesunden Menschen nur selten zu Hautinfektionen (Fitzpatrick et al., 1993). Einen wesentlichen Schutz stellt eine intakte physikalische Barriere dar. In diesem Zusammenhang

spielen die regelmäßige Erneuerung der Oberfläche und die damit verbundene Entfernung von adhärierenden Mikroorganismen eine wesentliche Rolle. Weiterhin von Bedeutung ist eine intakte physikalische Barriere, die im Bereich der Haut durch das *Stratum corneum* und in der Mukosa durch eine Schleimschicht gebildet wird. Zum Schutz vor Eindringen von Mikroorganismen tragen zudem der relativ niedrige pH-Wert der Haut (ca. 5,0, „Säureschutzmantel“) sowie eine Lipidbarriere aus langkettigen Fettsäuren bei (Übersicht in Fluhr und Elias, 2002; Candi et al., 2005).

Die physikalische Barriere zum Schutz vor Infektionen wird ergänzt durch das Zusammenspiel humoraler und zellulärer Mechanismen des adaptiven und angeborenen Immunsystems. So tragen neutrophile Granulozyten zur Abwehr von Bakterien und Pilzen bei, Parasiten können durch eosinophile Granulozyten eliminiert werden, virusinfizierte Zellen werden durch Killerzellen abgetötet. Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten sind weitere Zellen, die dem Schutz vor Mikroorganismen dienen. Diese Zellen zirkulieren jedoch zum großen Teil im Blut und werden erst durch verschiedene Botenstoffe wie Zytokine veranlasst, in die betroffenen Epithelien einzuwandern (Lüllmann-Rauch, 2003). Somit können diese Mechanismen nicht primär für die natürliche Resistenz der Haut gegen ständig drohende Infektionen verantwortlich sein.

Das angeborene Immunsystem erkennt hauptsächlich konservierte Strukturen von Pathogenen, so z.B. Lipopolysaccharide. Aus diesem Grund wird dieser Teil des Immunsystems als wenig variabel angesehen, bietet aber den Vorteil, potentielle Pathogene sehr schnell erkennen und bekämpfen zu können. Zum angeborenen Immunsystem werden z. B. das Komplementsystem, „Toll-like“-Rezeptoren, Granulozyten und Makrophagen gezählt (Albiger et al., 2007; Harder et al., 2007; Duncan et al., 2008; Murphy et al., 2008). Im Vergleich ist das adaptive Immunsystem hochvariabel und weist ein sogenanntes „immunologisches Gedächtnis“ auf, d.h. dass Pathogene, die bereits mit dem Organismus in Kontakt getreten sind, bei einem erneuten Kontakt schneller und effizienter bekämpft werden können. Die Immunantwort dauert hier – insbesondere wenn vorher keine Auseinandersetzung des Körpers mit dem Pathogen bestand – allerdings deutlich länger als beim angeborenen Immunsystem. Dennoch können diese beiden Systeme nicht unabhängig voneinander betrachtet werden, da viele Reaktionen des angeborenen Immunsystems das adaptive Immunsystem beeinflussen und umgekehrt.

Eine bedeutsame Rolle im Rahmen der angeborenen Immunität spielt die Produktion antimikrobieller Peptide (Ganz und Lehrer, 1998; Schröder 1999a; Zasloff, 2002; Boman, 2003), welche eine qualitative und quantitative Kontrolle der Mikroorganismen im Bereich der Haut erlauben.

### **1.3. Die Bedeutung antimikrobieller Peptide**

Bei den antimikrobiellen Peptiden handelt es sich vorwiegend um kleinere (3-5 kDa), kationische Polypeptide (Hancock und Diamond, 2000), die von Epithelzellen sowie von Zellen des Immunsystems gebildet werden und Mikroorganismen abtöten oder in ihrem Wachstum hemmen. Zudem konnte gezeigt werden, dass einige antimikrobielle Peptide Tumorzellen abtöten können (Kamysz et al., 2003). Sie werden dem angeborenen unspezifischen Abwehrsystem zugerechnet. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Proteine zudem die lokale Entzündungsantwort verändern und Mechanismen der zellulären und adaptiven Immunantwort aktivieren (Braff et al., 2005). Die Bedeutung von antimikrobiellen Substanzen zeigt sich bei wirbellosen Organismen besonders deutlich, da sie im Gegensatz zu Wirbeltieren nicht über eine adaptive Immunantwort verfügen.

Die antimikrobiellen Peptide lassen sich bisher in vier Hauptgruppen einteilen: Defensine, Cathelicidine, Ribonukleasen und S100-Proteine (Hansmann, 2009). Weitere, bisher nicht klassifizierbare antimikrobielle Peptide sind beispielsweise Dermcidin und Lactoferrine. Zu den bisher bekannten antimikrobiellen Peptiden der Haut zählen unter anderem Lysozym, Antileukoprotease und humanes  $\beta$ -Defensin (hBD)-2 und -3 (Chen et al., 1986; Wiedow et al., 1998; Harder et al., 1997; Harder et al. 2001). Einige dieser Peptide werden konstitutiv in der Haut exprimiert wie z.B. RNase 7, andere können induziert werden, so z. B. hBD-2 (Harder und Schröder, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass antimikrobielle Peptide im Rahmen verschiedener Hauterkrankungen von Bedeutung sind – so findet sich eine Induktion von Antileukoprotease bei Patienten mit Psoriasis vulgaris (Wingens et al., 1998). Bei Patienten mit Psoriasis, atopischer Dermatitis, subakut-kutanem Lupus erythematodes, Dermatitis herpetiformis Duhring und Nickel-Kontaktexzem konnte eine Expression von dem Cathelicidin LL-37 nachgewiesen werden, während in der Haut gesunder Personen keine Induktion nachgewiesen werden konnte (Frohm et al., 1997).

### **1.4. Der „Epidermale Differenzierungskomplex“**

Im menschlichen Genom finden sich häufig Genfamilien, deren Mitglieder auf einem Chromosom dicht beieinander liegen und hohe Sequenzhomologien aufweisen. Diese Genfamilien, die auch als Gencluster bezeichnet werden, codieren beispielsweise für die  $\alpha$ -Globin-Einheiten des Hämoglobins (Barton et al., 1982). In der Region 1q21.3 findet sich

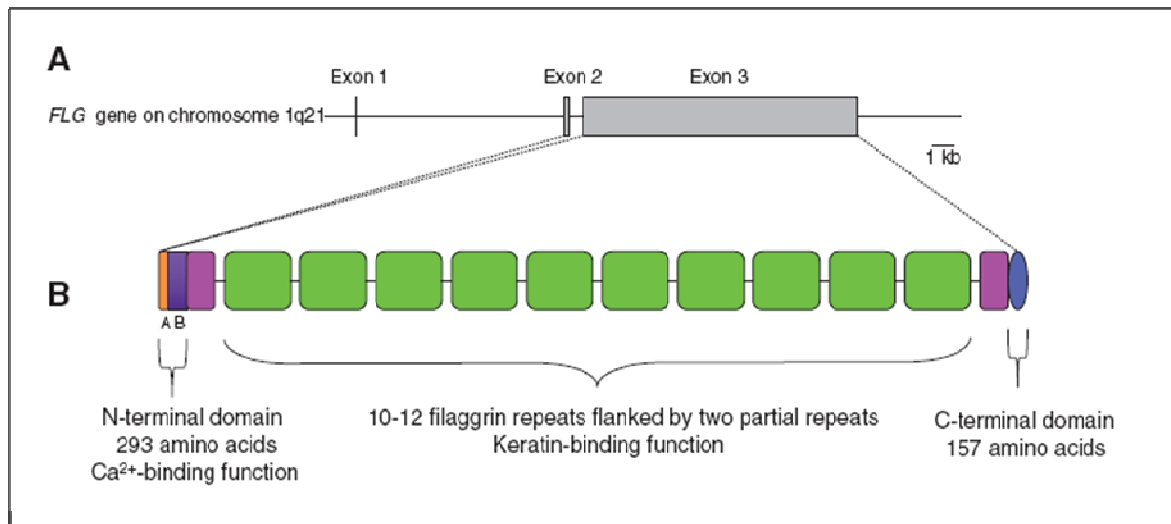
ein solcher Cluster, dessen Besonderheit darin liegt, dass die hier lokalisierten Gene für Proteine codieren, die unter anderem an der Ausbildung der Epidermis beteiligt sind. Da es sich bei den Proteinen um Mitglieder verschiedener Proteinfamilien handelt, wird diese Anordnung auch als Genkomplex bezeichnet. Dementsprechend wird die Region 1q21.3 als „Epidermaler Differenzierungskomplex“ bezeichnet (Mischke et al., 1996). Die Proteine lassen sich im Wesentlichen vier Familien zuordnen: der Familie der S100-Proteine, der „Late Cornified Envelope“-Proteine, der „Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteine und der „S100 Fused Type“-Proteine, zu der auch das in dieser Arbeit untersuchte Profilaggrin gehört (Mischke et al., 1996; Jackson et al., 2005).

Weitere Proteine der „S100 Fused Type“-Familie sind Cornulin, Repetin und Trichohyalin und die in unserer Arbeitsgruppe bereits untersuchten Hornerin, Trichohyalin-like 1 und Ifapsorin/Filaggrin-2. Diese Proteine weisen sowohl charakteristische Sequenzmerkmale der S100-Proteine als auch der „Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteine auf. Die S100-Proteine sind charakterisiert durch ihre N-terminalen potentiellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Domänen, die S100-Domäne sowie EF-Hand-Domäne. Ein typischen Vertreter dieser Proteine stellt Psoriasin (S100A7) dar (Gläser et al., 2005). Die „Cornified Cell Envelope Precursor“-Proteine, zu denen unter anderem Loricirin zählt, zeichnen sich durch eine unterschiedliche Anzahl an Tandemsequenzwiederholungen aus (Candi et al., 1995). Weiterhin konnte für die „S100 Fused Type“-Proteine nachgewiesen werden, dass ihre Expression  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig erfolgt (Dale et al., 1983; Ishida-Yamamoto et al., 1997; Makino et al., 2001; Contzler et al., 2005; Huber et al., 2005). Weitere charakteristische Merkmale der „S100 Fused Type“-Familie werden im Folgenden am Beispiel von Profilaggrin erläutert.

### 1.5. Profilaggrin

Bei Profilaggrin handelt es sich um eines der am längsten bekannte Proteine der „S100 Fused Type“-Familie (Dale, 1977; Resing et al., 1995). Es wird als unlösliches und hochphosphoryliertes Protein in den F-Keratohyalingranula der Keratinozyten gelagert und in der Haut sowie auch in Ösophagus und Zunge exprimiert (Steven et al., 1990; Makino et al., 2003). Wie bei allen anderen Mitgliedern des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ findet sich auch das kodierende *FLG*-Gen auf Chromosom 1q21.3. Dieses Gen enthält drei Exons und zwei Introns (Presland et al., 1992; Markova et al., 1993), wobei das Exon 1 nicht-kodierend ist und die Translation in Exon 2 beginnt. Der Hauptteil des Profilaggrins wird durch das große dritte Exon kodiert (siehe Abb. 1.2.).





**Abb. 1.2.: Aufbau des *Filaggrin*-Gens und Proteinstruktur von Profilaggrin.** A: Das humane *Filaggrin*-Gen liegt im Bereich des „Epidermalen Differenzierungskomplexes“ auf Chromosom 1q21.3. Es besteht aus drei Exons und zwei Introns. Der Hauptteil von Profilaggrin wird durch das Exon 3 kodiert. B: Profilaggrin setzt sich aus zehn bis zwölf identischen, 324 Aminosäuren großen Filaggrin-Einheiten zusammen, die untereinander durch Linker-Regionen miteinander verbunden sind. Beidseits werden diese Filaggrin-Monomere von jeweils einer trunkierten Filaggrin-Einheit flankiert und von einer N-terminalen und C-terminalen Domäne begrenzt (aus Sandilands et al., 2009).

Humanes Profilaggrin ist ein etwa 400 kDa schweres, Histidin-reiches Protein, das sich aus zehn bis zwölf identischen Filaggrin-Einheiten zusammensetzt, die beidseitig durch zwei partielle Filaggrin-Einheiten sowie eine N- und eine C-terminale Einheit flankiert werden (siehe Abb. 1.2., McKinley-Grant et al., 1989; Gan et al., 1990; Presland et al., 1992). Jede dieser Filaggrin-Einheiten weist eine Linker-Region auf und besteht aus 324 Aminosäuren. Die Linker-Regionen werden bei der Prozessierung des als Proprotein synthetisierten Profilaggrin-Moleküls in die aktiven Filaggrin-Untereinheiten gespalten. An der Prozessierung, die erst nach Dephosphorylierung erfolgen kann, sind Enzyme wie Matriptase, Furin, Profilaggrin Endoprotease und Caspase 14 beteiligt (Resing et al., 1995b; Pearton et al., 2001; List et al., 2003; Denecker et al., 2008). Diese Untereinheiten können Keratinfilamente bündeln und dadurch zum Kollaps des Zytoskeletts am Übergang des *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* führen; dies begünstigt die abgeflachte Zellform, die charakteristisch für das *Stratum corneum* ist (Dale et al., 1997; Candi et al., 2005). Durch weitere Prozessierung der Monomere im *Stratum corneum* entstehen einzelne Aminosäuren und deren Derivate, zum Beispiel Pyrrolidon-Carbonsäure, die in der Haut als „Natural Moisturizing Factors“ – natürliche Flüssigkeitsspeicher – wirken (Rawlings et al., 1994; Harding et al., 2000).

Die N-terminale Domäne, die im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht wurde, besteht aus 293 Aminosäuren und kann in zwei Subdomänen unterteilt werden – die Domäne A enthält 81 Aminosäuren, die Domäne B setzt sich aus 212 Aminosäuren zusammen (Presland et al., 1992; Pearton et al., 2002). In der Domäne A sind zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen lokalisiert (Presland et al., 1995), die es wahrscheinlich machen, dass  $\text{Ca}^{2+}$  eine bedeutsame Rolle bei der Prozessierung von Profilaggrin im Rahmen der terminalen Differenzierung der Epidermis spielt (siehe 1.4.). Die Domäne B enthält eine Signalsequenz, welche die Translokation der N-terminalen Domäne in den Zellkern der terminal differenzierenden Keratinozyten ermöglicht (Ishida-Yamamoto et al., 1998; Pearton et al., 2002; Zhang et al., 2002). Diese Translokation scheint bei der Umwandlung der vitalen Keratinozyten des *Stratum granulosum* in die avitalen Korneozyten des *Stratum corneum* von Bedeutung zu sein.

Die C-terminale Domäne des humanen Profilaggrins, die in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe genauer untersucht wird, besteht aus 157 Aminosäuren (Presland et al., 1992). Die genaue Bedeutung dieser Domäne ist noch nicht geklärt. Dennoch gibt es Anzeichen dafür, dass diese Abschnitte eine Rolle bei der Prozessierung von Profilaggrin in seine Filaggrin-Untereinheiten spielen. So konnte gezeigt werden, dass in der Haut von Personen mit Mutationen im Bereich der C-terminalen Domäne keine Prozessierung in Filaggrin-Monomere erfolgte (Sandilands et al., 2007).

In weiteren neueren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass eine Assoziation zwischen verschiedenen Mutationen im *FLG*-Gen und verschiedenen Erkrankungen der Haut besteht. So fanden sich bei irischen Kindern mit atopischer Dermatitis gehäuft die „loss of function“-Mutationen R501X und 2282del4 (Palmer et al., 2006). Ähnliche Assoziationen sind für Ichthyosis vulgaris beschrieben (Sandilands et al., 2007).

### 1.6. Fragestellung der Arbeit

Untersuchungen von Proteinextrakten des *Stratum corneum* gesunder Menschen nach Auftrennung durch HPLC zeigten neben den drei dominierenden antimikrobiellen Proteinen RNase-7, Psoriasin und Lysozym weitere Proteine und Peptide, die auf antimikrobielle Eigenschaften untersucht wurden. So konnte in unserer Arbeitsgruppe für Fragmente der „S100 Fused Type“-Proteine Hornerin und Ifapsoriasin/Filaggrin-2 antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden. Diese Befunde ließen vermuten, dass auch das quantitativ dominierende „S100 Fused Type“-Protein der Haut Profilaggrin antimikrobielle Aktivität aufweisen könne. So konnten bei weiteren HPLC-Analysen von *Stratum corneum*-Extrakten in antimikrobiell Aktivität enthaltenden Fraktionen Peptide identifiziert werden, die der N-terminalen Region von Profilaggrin entsprechen. Bei Patienten mit Atopischer Dermatitis



führen „loss-of-function“-Mutationen im Filaggrin-Gen zu einer Störung der Barrierefunktion. Die Folgen sind ein vermehrter Wasserverlust, eine Austrocknung und eine erhöhte Infektanfälligkeit der Haut. Die Ursache dieser Infektanfälligkeit ist bisher ungeklärt. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass Peptidfragmente des Profilaggrins antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Im Rahmen dieser Dissertation war deshalb geplant, die Filaggrin-Fragmente PFLG<sub>91-122</sub> (entspricht PFLG-3) und PFLG<sub>87-197</sub> (entspricht PFLG-4) rekombinant zu exprimieren, aufzureinigen und hinsichtlich möglicher antimikrobieller Eigenschaften zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

Alle nicht aufgeführten Materialien wurden von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Steinheim).

### 2.1. Chemikalien

1 kb-DNA-Größenstandard	NEB, Ipswich, USA
100 bp-DNA-Größenstandard	NEB, Ipswich, USA
Acetonitril	Promochem GmbH, Wesel
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
dNTPs	Pharmacia, Freiburg
EDTA	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	USB, Cleveland, USA
H <sub>2</sub> O (für HPLC)	Promochem GmbH, Wesel
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe
MES	Invitrogen, Karlsruhe
SDS	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue® Plus2 Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Smart-DNA-Größenstandard	Eurogentec, Köln
Trifluoressigsäure	Promochem GmbH, Wesel
TSB	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal	Boehringer, Ingelheim

### 2.2. Vektoren

pGEM-T-Vektor	Promega, Mannheim
pSUMO3-Vektor	LifeSensors, Malvern, USA

## 2.3. Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide (Primer) wurden von Sigma-Genosys (Steinheim) synthetisiert.

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')
-------------	-----------------------

### 2.3.1. Primer für "Nested-PCR"

PFLG-157bp-F	TTTCGGCAAATCCTGAAGAATCCAG
PFLG-714bp-R	TGGCAATATGGCCTGATTGTATCCAT

### 2.3.2. Primer für pSUMO3-System

pSUMO3-PFLG-3-F	GCAGGTCTCAAGGTAAAGAGAATTTACCGATATCAGG
pSUMO3-PFLG-3-R	GCAGGATCCTTATCTGTTTTCTTTGTTTTCTTCCT
pSUMO3-PFLG-4-F	GCAGGTCTCAAGGTGAGTCTACCAGAAAAGAGAATT
pSUMO3-PFLG-4-R	GCAGGATCCTTACCTATTGTCTCCTAATCTAGTA

### 2.3.3. Vektorprimer für „Colony-Check-PCR“ und Sequenzierungen

M13-F	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC
T7-Term-Short	CTAGTTATTGCTCAGCGG
T7-SUMO-Reverse	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

## 2.4. Enzyme

Lysozym, human, Sigma L 8405	Sigma, Steinheim
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase + Puffer	Stratagene, La Jolla, USA
Restriktionsenzyme <i>Bsa</i> 1	NEB, Ipswich, UK
<i>Bam</i> H1	

SUMO Protease 2

T4-DNA-Ligase + Ligation Buffer

Promega, Mannheim

*Taq*-DNA-Polymerase + Puffer

Invitrogen, Karlsruhe

## 2.5. Puffer und Lösungen

Coomassie-Färbelösung

25% Ethanol

7% Essigsäure

0,2% Coomassie Brilliant Blau R250

DANN-Ladepuffer L VI (für Agarose-Gel)  
(6x)

0,25% Bromphenolblau

30% Glycerin

10mM Tris/HCl

pH 7,0

Elutionspuffer (für Immobilisierte  
Metallionen-Affinitätschromatographie)

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

pH 8,0

Entfärbelösung (nach Coomassie-Färbung)

25% Isopropanol

7 % Essigsäure

LEW-Puffer

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

300 mM NaCl

pH 8,0

MES-SDS-Laufpuffer (20x)

1M MES

1M Tris

	69,3 mM SDS
	20,5 mM EDTA
	pH 7,4
TAE-Puffer (50x)	Tris-Base (2M) 24,2g
	Natriumacetat (1M) 5,71 g
	EDTA (0,5 M, pH 8) 10 ml
TFA-Lösungen	
Puffer A	0,1% Trifluoressigsäure in H <sub>2</sub> O
Puffer B (C4/C8)	0,1% Trifluoressigsäure in Acetonitril
Puffer B (C2/C18)	0,1% Trifluoressigsäure in 80% Acetonitril

## 2.6. Nährmedien

Lysogenic Broth (LB)-Medium:

- 1 % Sojamehlpepton
- 0,5 % NaCl
- 0,5 % Hefe-Extrakt
- ad* 1000 ml mit H<sub>2</sub>O,
- pH 7,4 mit HCl eingestellt,
- autoklaviert

LB-Agar:

- LB-Medium
- 15 g Agar

PBS-Medium:

- 0,8 % NaCl
- 0,02 % KCl
- 0,115 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
- 0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 6,8

Trypticase-Soy-Broth (TSB)-Medium: 30 g TSB  
ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O,  
pH 7,4 mit HCl eingestellt,  
autoklaviert

TSB-Agar: TSB-Medium  
15 g Agar

SOC – Medium :

2 % Pepton  
0,5 % Hefe – Extrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
nach Autoklavieren:  
20 mM Glukose  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>

## 2.7. Einwegmaterial

Küvetten für Photometer UVette®	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäße (Tubes, 1,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäße (15 ml + 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, Filtropur 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.8. Kits

NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
Protino® Ni-TED packed columns	Macherey-Nagel, Düren
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

## 2.9. Geräte

### Gefrierschränke/ -truhen

Kryosafe (- 80 °C)	Hans Schröder GmbH, Hamburg
--------------------	--------------------------------

Premium	Liebherr, Biberach
---------	--------------------

<b>Geldokumentationsanlage und Auswertungssoftware</b>	Biometra, Göttingen
--	---------------------

### Gelkammern

Horizon 11·14	Invitrogen, Karlsruhe
---------------	-----------------------

## HPLC

### Gradientenpumpen

Liquid Chromatograph LC-10AT VP	Shimadzu, Duisburg
FCV-10 AL VP	Shimadzu, Duisburg
SpectraSystem P4000	Spectra Physics, Darmstadt

### Detektor

UV-VIS Detector SPD-10A VP	Shimadzu, Duisburg
----------------------------	--------------------

### Entgaser

Degasser DG-4	Henggeler, Riehen, Schweiz
---------------	----------------------------

### Integratoren

SP 4270 integrator	Spectra Physics, Darmstadt
SP 4290 integrator	Spectra Physics, Darmstadt

### Trennsäulen

SP 250/10 NUCLEOSIL 300 – 7 C8	Macherey-Nagel, Düren
Vorsäule SP 50/10	Macherey-Nagel, Düren
Jupiter 5u C4 300 A	Phenomenex, Aschaffenburg
µRPC C2/C18 SC 2.1/10	Pharmacia, Freiburg

## Konzentratoren

Lyophilisator Alpha 2-4 LSC	Christ, Osterode
Vakuumpumpe KAS 16	Pfeiffer Vacuum, Asslar
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Gel Pump GP 100	Savant, Gaithersburg, USA

## Laborwaage

Kern, Albstadt

## Massenspektrometer

„QTOF II“	Micromass, Manchester, UK
-----------	---------------------------



MassLynx-Auswertungssoftware

Mikromass, Manchester, UK

### **Photometer**

150-20 Spectrophotometer

Hitachi, Wiesbaden

Biophotometer

Eppendorf, Hamburg

### **Pipetten**

Eppendorf, Hamburg

### **Rotationsschüttler (Vortexer)**

Janker und Kunkel, Staufen

### **Thermoblock**

Thermomixer comfort

Eppendorf, Hamburg

### **Thermocycler**

PTC-200 DNA-Engine

MJ Research, Waltham, USA

T3 Thermocycler

Biometra, Göttingen

### **Ultraschall**

Sonopuls GM70

Bandelin Elektronik, Berlin

### **UV-Tisch**

high performance transilluminator

Ultraviolet products, LLC  
Upland, USA

### **Zentrifugen**

Centrifuge 5417 R

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5804 R

Eppendorf, Hamburg

## 2.10. Mikroorganismen

<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11303	
	BL21(DE3)pLysS	Novagen/Merck, Darmstadt
	TOP10F'	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	

Alle ATCC-Stämme wurden freundlicherweise vom Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, bereitgestellt.

## 2.11. Weitere Materialien

ProtParam tool	ExPaSy (Export Protein Analysis System; <a href="http://www.expasy.org">http://www.expasy.org</a> )
Xcell sure lock Mini-Cell-Gelsystem	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.12. Molekularbiologische Methoden

### 2.12.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis et al., 1986) ist ein in vitro-Verfahren zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragmentes. Sie wurde für die Amplifikation der PFLG-3- und PFLG-4-Sequenzen sowie zur Überprüfung von Plasmiden auf inserierte PCR-Produkte eingesetzt.

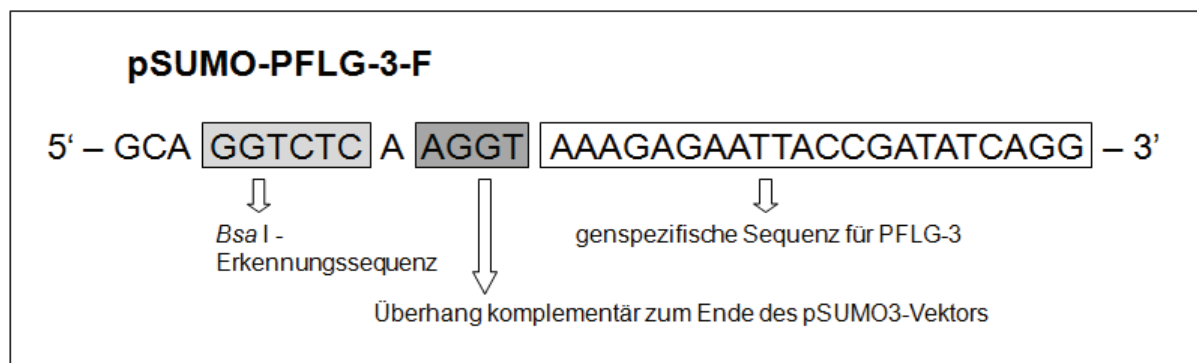
Die Reaktion wurde dafür in einem Thermocycler (PTC–200, MJ Research, Waltham, USA) jeweils in einem Gesamtvolumen von 20 bzw. 50 µl durchgeführt. Bestehend aus den Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Kettenverlängerung wurde die PCR in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Spezifität der Oligonukleotid-Primer in Bezug auf die vom Hersteller (Sigma–Genosys, Steinheim) angegebenen Schmelzpunkte variiert.

Die für die PCR verwendeten Primer sind unter 2.3. aufgeführt. Die verschiedenen PCR–Anwendungen werden im Folgenden erläutert.

#### 2.12.1.1. Design der Primerpaare für die „Nested-PCR“

Um die PFLG-3- und PFLG-4-DNA-Sequenz später in den pSUMO3-Vektor ligieren bzw. eine Restriktionshydrolyse durchführen zu können, ist es notwendig, neben der eigentlichen Primersequenz weitere Basenpaare anzuhängen.

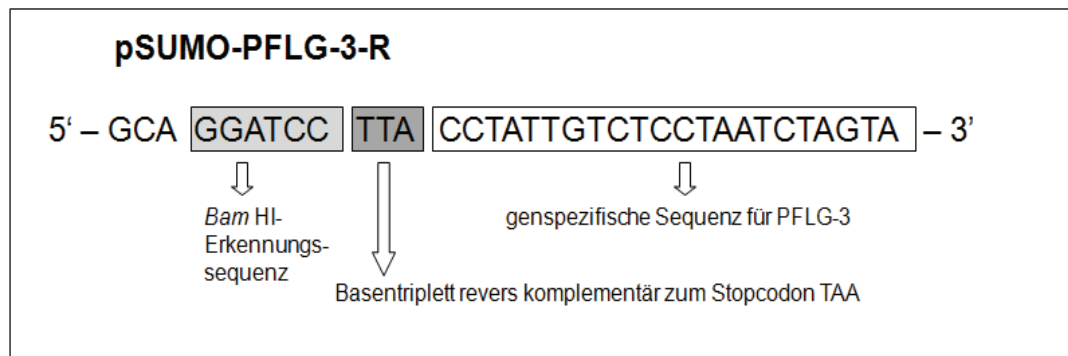
Dies ist am Beispiel des pSUMO3-PFLG-3-Vorwärtsprimers in Abb.2.1. gezeigt:



**Abb. 2.1.: Primerdesign am Beispiel des pSUMO3-PFLG-3-Vorwärtsprimers**

**GGTCTC** stellt die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bsa*I dar. Die Basen **AGGT** bilden einen Überhang, der komplementär zum 5'-TCCA-3'-Überhang des pSUMO3-Vektors ist und damit die Ligation in diesen Vektor ermöglicht. Bei den ersten drei Basen des Primers handelt es sich um optional angehängte Basen, die eine effizientere Restriktionshydrolyse ermöglichen. Hierbei ist es nicht von Bedeutung, welche Nukleotide verwendet werden.

Die Basenabfolge für den Rückwärtsprimer ist am Beispiel des pSUMO3-PFLG-4-Rückwärtsprimers in Abb.2.2. gezeigt:



**Abb. 2.2.: Primerdesign am Beispiel des pSUMO3-PFLG-4-Rückwärtsprimers.**

Die *Bam*H1-Erkennungssequenz stellt gleichzeitig die Schnittstelle für *Bam* H1 dar.

GGATCC stellt die Erkennungs- und Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bam*H1 dar. Die Basenabfolge TTA ist revers komplementär zu einem Stopcodon (TAA). Dies ist nötig, damit die später ablaufende Transkription im Rahmen der Expression an dieser Stelle endet und somit die zu exprimierenden Proteine die richtige Größe aufweisen. Für die ersten drei Basen des Rückwärtsprimers gilt das gleiche wie für die ersten drei Basen des Vorwärtsprimers (siehe oben).

#### 2.12.1.2. Amplifikation der zu klonierenden Sequenzen mittels „Nested-PCR“

Bei der „Nested-PCR“ handelt es sich um eine Variante der Polymerase-Kettenreaktion. Zur Herstellung zweier Fragmente des humanen Profilaggrin-Proteins wurden zunächst mit spezifischen Primern größere Fragmente von Keratinozyten-cDNA amplifiziert, die für die anschließenden „Nested-PCRs“ als Matrize dienten. Bei der „Nested-PCR“ wurden dann mit Hilfe von weiter innen liegenden Primerpaaren die benötigten Fragmente für PFLG-3 und PFLG-4 amplifiziert. Die Wahl einer solchen Strategie ist sinnvoll, wenn Primer zusätzliche, nicht-genspezifische Ankersequenzen tragen. Hier kommt es oft zu einer Amplifikation unspezifischer Genprodukte. Durch die deutliche Verkürzung des DNA-Abschnittes mittels der ersten Standard-PCR wird die Wahrscheinlichkeit der Bindung an unspezifische DNA-Sequenzen und somit auch die Amplifikation unspezifischer Produkte deutlich vermindert.

Zunächst wurde hier ein Fragment mit Hilfe des ersten Primerpaares (PFLG-157bp-F und PFLG-714bp-R) amplifiziert, welches dann als Matrize für die zweite PCR verwendet wurde. Durch ein zweites Primerpaar (pSUMO3-PFLG-3-F bzw. pSUMO3-PFLG-4-F und pSUMO3-PFLG-3-R bzw. pSUMO3-PFLG-4-R) wurden die zu klonierenden Sequenzen von PFLG-3 und PFLG-4 amplifiziert. Sie werden auch als „Nested Primer“ bezeichnet, da sie innerhalb des ersten Fragmentes binden.

Für diese Methode wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. Im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* weist diese aus *Pyrococcus*

*furiosus* stammende Polymerase eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität auf, so dass falsch eingebaute Nukleotide entfernt werden („proof reading“) und somit die Genauigkeit der DNA-Synthese erhöht wird (Kunkel, 1992).

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Standard-PCR:

- 2,0 µl 10x *Pfu*-cloned-buffer (Stratagene)
- 0,4 µl dNTPs (10 mM)
- 0,5 µl PFLG-157-bp-F-Primer (10 µM)
- 0,5 µl PFLG-714-bp-R-Primer (10 µM)
- 0,5 µl cDNA
- 14,1 µl H<sub>2</sub>O
- 0,2 µl *Pfu*-Polymerase (Stratagene, 2,5U/µl) in 1,8 µl H<sub>2</sub>O, Zugabe erst bei 85° C

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95° C – 2 min

85° C – 1 min - Zugabe der *Pfu*-Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)

95° C – 30 s	}	35 Zyklen
61° C – 30 s		
72° C – 2 min		

72° C – 5 min

4° C - ∞

## 2 Material und Methoden

„Nested-PCR“:

- 2,0  $\mu$ l 10x *Pfu*-cloned-buffer (Stratagene)
- 0,4  $\mu$ l dNTPs (10 mM)
- 0,5  $\mu$ l pSUMO3-PFLG-3-F- bzw. 4-F-Primer(10  $\mu$ M)
- 0,5  $\mu$ l pSUMO3-PFLG-3-R- bzw. 4-R-Primer(10  $\mu$ M)
- 5  $\mu$ l DNA (1:100 verdünnt; aus erster PCR, mittels Gel-Extraktion gewonnen )
- 9,6  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 0,5  $\mu$ l *Pfu*-Polymerase (Stratagene, 2,5U/ $\mu$ l) in 1,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, Zugabe erst bei 85° C

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95° C – 2 min

85° C – 1 min - Zugabe der *Pfu*-Polymerase (Stratagene, LaJolla, USA)

95° C – 30 s	}	8 Zyklen
53° C – 30 s		
72° C – 1 min		

95° C – 30 s	}	25 Zyklen
72° C – 1 min 15 s		

72° C – 5 min

4° C -  $\infty$  - Zugabe von 0,5  $\mu$ l *Taq*-Polymerase (5U/ $\mu$ l, Invitrogen, Karlsruhe) zur  
Generierung von A-Überhängen

72°C – 20 min

4°C - ∞

Die Zugabe der *Taq*-Polymerase ermöglicht die Generierung von A-Überhängen am 3'-Ende. Dies ermöglicht die Ligation in den pGEM-T-Vektor (Promega) mit T-Überhängen am 3'-Ende.

Anschließend wurde das Amplifikationsprodukt durch eine Gelelektrophorese (siehe 2.12.2) überprüft und mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert. Daraufhin wurde das Produkt in den pSUMO3-Vektor ligiert (2.12.4.) und in kompetente *Escherichia coli* TOP10F'-Zellen transformiert (siehe 2.12.5.).

### 2.12.1.3. „Colony-Check-PCR“ zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung

Das Verfahren der „Colony-Check-PCR“ bietet die Möglichkeit der Überprüfung, ob die Bakterien einen Vektor mit dem richtigen „Insert“ aufgenommen haben. Im Anschluss an die Transformation (siehe 2.12.5.) wurden jeweils sechs gewachsene Kolonien ausgewählt und mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze direkt vom Nähragar in Reaktionsgefäße mit 20 µl PCR-Mix (s. unten) überführt.

Für den pGEM-T-Vektor wurden die M-13-Forward- und M-13-Reverse- Primer und für den pSUMO3-Vektor die pSUMO3-PFLG-3-F- bzw. pSUMO3-PFLG-4-F- und T7-Term-Short-Primer verwendet (siehe 2.3.). Falls der Vektor das „Insert“ nicht aufgenommen hätte, wären nur Abschnitte des Vektors amplifiziert worden, während mit dem aufgenommenen „Insert“ ein entsprechend größeres Fragment amplifiziert wurde.

Für die PCR wurde für den pGEM-T-Vektor folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 2,0 µl Puffer (10x)
- 0,4 µl dNTPs (10 mM)
- 0,5 µl M-13-F-Primer (10 µM,)
- 0,5 µl M-13-R-Primer (10 µM)
- 0,6 µl MgCl<sub>2</sub>
- 14,0 µl H<sub>2</sub>O
- 0,2 µl *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) in 1,8 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 10 min	-ausreichend lange, um die B akterien zu zerstören und die DNA zu denaturieren	
95 °C - 45 s	} 30 Zyklen	
50 °C - 30 s		
72 °C - 50 s		
72 °C - 5 min		
4 °C - ∞		

Für die PCR wurde für den pSUMO3-Vektor wurde ein Reaktionsansatz verwendet, der dem Reaktionsansatz für den pGEM-T-Vektor (s. oben) weitgehend entsprach. Lediglich wurden hier 0,5 µl pSUMO3-PFLG-3-F- bzw. 4-F-Primer (10 µM) und 0,5 µl T7-Term-Short-Primer (10 µM) eingesetzt.

Die PCR wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C - 10 min	- ausreichend lange, um die Bakterien zu zerstören und die DNA zu denaturieren	
95 °C - 1 min	} 30 Zyklen	
55 °C - 30 s		
72 °C - 2 min		
72 °C - 3 min		
4 °C - ∞		

### 2.12.2. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes (Ethidiumbromid), der in doppelsträngiger DNA interkaliert, lassen sich unter UV-Durchleuchtung die verschiedenen DNA-Fragmente detektieren.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur präparativen Gewinnung von mittels PCR (siehe 2.12.1.) erzeugten DNA-Fragmenten, zur Analyse von PCR-Produkten, Gel-Extrakten,



Plasmidpräparationen und Restriktionshydrolysen in 0,8 bis 1,5 %igen horizontalen Agarose-Gelen eingesetzt.

Zur Herstellung der Gele wurden 0,8 bis 1,5 g Agarose in 100ml TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20mM Acetat, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 50° C abgekühlt war, wurden 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben und anschließend die Lösung in eine horizontale Laufkammer (Horizon 11·14; Invitrogen, Karlsruhe) mit Probenkamm gefüllt. Nach Aushärten des Gels, Entfernung des Probenkamms und Auffüllen der Laufkammer mit 1x TAE-Puffer wurden die Taschen mit den PCR-Produkten, die zuvor mit dem Ladepuffer LVI (siehe 2.5.) versetzt wurden, gefüllt. Um den detektierten Banden eine Größe zuordnen zu können, wurden als Marker je nach erwarteter Fragmentgröße entweder eine 100bp-DNA-Größenstandard (NEB, Ipswich, USA), 1 kb-DNA-Größenstandard (NEB, Ipswich, UK) oder eine Smart-DNA-Größenstandard (Eurogentec, Köln) verwendet. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die Banden durch Fluoreszenz mit Hilfe eines UV-Transilluminators (high performance transilluminator, Ultraviolet products, CA, USA) bei 266 nm sichtbar gemacht, photographisch dokumentiert und gegebenenfalls mit einem sterilen Einmalskalpell ausgeschnitten.

### 2.12.3. Gel-Extraktion

Für sich anschließende Ligationen (siehe 2.12.4.) oder eine weitere PCR („Nested-PCR“ (siehe 2.12.1.2.)) erfolgte eine Aufreinigung von aus der PCR oder Restriktionshydrolysen gewonnenen DNA-Fragmenten mittels Gel-Extraktion. Nachdem die Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten wurden, erfolgte die Elution der DNA aus den Gelstücken mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Lediglich wurde hier anstelle des vom Hersteller empfohlenen 5-10 mM Tris mit 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

Zur Kontrolle und zur Abschätzung des DNA-Gehaltes durch Vergleich der Bandenintensitäten von DNA-Fragmenten mit einem DNA-Größenstandard (1 kb-DNA-Größenstandard, NEB, Ipswich) erfolgte eine weitere Gelelektrophorese mit 2 µl der gewonnenen Proben.

### 2.12.4. Ligation

Die Ligation dient dazu, amplifizierte DNA-Sequenzen in Vektoren einzuschleusen, damit diese dann geschlossenen Vektoren anschließend in Bakterienstämme transformiert werden können.

Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um den reinen Klonierungsvektor pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim) und den Expressionsvektor pSUMO3 (LifeSensors, Malvern, USA). Es wurde das zu ligierende DNA-Fragment im achtfachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Folgende 10 µl Ligationsansätze wurden verwendet:

Ligationsansatz für den pGEM-T-Vektor:

- 5 µl 2x Ligation Buffer (Promega, Mannheim)
- 0,5 µl pGEM-T-Vektor (50 ng/µl, Promega, Mannheim)
- 0,7 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl, Promega, Mannheim)
- 3,8 µl PCR-Produkt

Da die Banden bei der vorangegangenen Gel-Extraktion auf sehr geringe Insert-Mengen hindeuteten, wurde die maximal mögliche Menge an PCR-Produkt verwendet. Ansonsten ist der Ligationsansatz mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufzufüllen.

Ligationsansatz für den pSUMO3-Vektor:

- 2 µl 5x T<sub>4</sub>-DNA-Ligase Puffer (Promega, Mannheim)
- 1,0 µl pSUMO3-Vektor ((25 ng/µl); Life Sensors, Malvern, PA, USA)
- 0,7 µl T<sub>4</sub>-DNA-Ligase (Promega, Mannheim)
- 6,3 µl PCR-Produkt

Die Ligation erfolgte jeweils für 8 Stunden bei 16 °C.

### 2.12.5. Transformation

Für die Transformation erforderliche CaCl<sub>2</sub>-kompetente *Escherichia coli*-Zellen wurden mir freundlicherweise aus vorhandenen Laborbeständen bereitgestellt. Ihre Herstellung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im T-Cloning Kit Manual der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). Zur zwischenzeitlichen Lagerung wurden 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Transformation, modifiziert nach Tang und Mitarbeitern (Tang et al, 1994), wurde zur Übertragung von rekombinanter DNA in Bakterienzellen eingesetzt:

Durch vorsichtiges Umrühren wurden 15 µl Ligationsansatz (1:10 verdünnt) oder 2 µl Plasmid-DNA mit jeweils 50 µl kompetenten *Escherichia coli* (TOP10F' (Invitrogen, Karlsruhe) bzw. BL21(DE3)pLysS (Novagen/Merck, Darmstadt) vermischt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung bei 42° C für 30 s wurden die Proben erneut für 3 min auf Eis gelagert und daraufhin 250 µl auf 37° C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugefügt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37° C und 700 Upm wurde der gesamte Transformationsansatz auf vorgewärmte Agarplatten ausplattiert. Diese Platten sind zuvor mit den für die jeweiligen Plasmide selektiven Antibiotika und für den Fall einer Blau-Weiß-Selektion (bei Verwendung der pGEM-T-Vektor tragenden Plasmide) zusätzlich mit 20 µl IPTG und 50 µl TSP + 20 µl X-Gal versetzt worden. Die jeweils verwendeten Agarplatten und Antibiotika finden sich in Tab. 2.2. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37° C.

Im Falle eines erfolgreichen Einklonierens eines „Inserts“ in den pGEM-T-Vektor ist die kodierende Sequenz der  $\beta$ -Galaktosidase durch das „Insert“ unterbrochen, so dass das Enzym nicht mehr exprimiert wird und folglich kein X-Gal mehr gespalten wird. Dies hat zur Folge, dass kein blauer Farbstoff entsteht und die Kolonie auf der Agarplatte weiß erscheint. Ausgewählte Klone (also im Falle der Blau-Weiß-Selektion weiße Klone) wurden mittels „Colony-Check-PCR“ (siehe 2.12.1.3.) auf das korrekte „Insert“ hin überprüft und die Plasmide mit Hilfe einer Plasmidisolierung aufgereinigt.

**Tab. 2.1.: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme**

<b><i>Escherichia. coli</i>-Stamm</b>	<b>Antibiotika-Resistenz</b>
<b>TOP 10F'</b>	-
<b>BL21 (DE3)pLysS</b>	Chloramphenicol (34 µg/ml)

**Tab. 2.2.: Antibiotika-Resistenzen der verwendeten Vektoren und jeweils eingesetzte Agarplatten**

Vektor	Antibiotika-Resistenz	Verwendete Agarplatten
pGEM-T	Ampicillin (100 µg/ml)	TSB-Platten
pSUMO3	Kanamycin (50 µg/ml)	LB-Platten

### 2.12.6. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde das „NucleoSpin® Plasmid QuickPure“-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet, so dass diese für weitere Transformationen (siehe 2.12.5.), Sequenzierungen (siehe 2.12.7.) und Restriktionshydrolysen (siehe 2.12.8.) verwendet werden konnte. Das Prinzip basiert auf einer Kombination aus alkalischer Lyse von Bakterienzellen, der Bindung von DNA an eine Silica-Membran und nachfolgender Elution. Die Plasmidpräparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Macherey-Nagel, Plasmid DNA Purification, User manual NucleoSpin® Plasmid QuickPure, March 2005/Rev. 02) und das erhaltene Eluat wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.12.2.) überprüft.

### 2.12.7. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung einer Auswahl der isolierten Plasmid-DNA wurden jeweils 5 µl Plasmid und 2 µl T7-Term-Short-Primer (bereits gemischt) an die Firma SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) geschickt. Dort wurde eine „HotShot“-Sequenzierung durchgeführt - einem Verfahren, das sich der Fluoreszenzfarbstoff-basierten Sequenzierung bedient.

### 2.12.8. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Restriktionsverdau dient dazu, ligierte PCR-Fragmente aus dem pGEM-T-Klonierungsvektor (Promega, Mannheim) herauszuschneiden. Die dabei gewonnenen Fragmente werden in einer nachfolgenden Ligation (siehe 2.12.4.) in den pSUMO3-Expressionsvektor (LifeSensors, Malvern, USA) eingefügt. Die jeweiligen Inserts konnten spezifisch mit den Restriktionsendonukleasen *Bsa*1 (NEB, Ipswich) und *Bam*H1 (NEB, Ipswich) herausgeschnitten werden, da die pSUMO3-PFLG-3- und PFLG-4-Primer mit einer *Bsa*1- und *Bam*H1-Schnittstelle ausgestattet wurden.

Für einen 50 µl-Ansatz wurde verwendet:

- 5 µl 10x NE Puffer 2 (New England Biolabs, NEB)
- 7 µl pGEM-T-Vektor mit Insert (hier Zugabe der laut Versuchsprotokoll maximal möglichen Menge, da aufgrund sehr schwacher Bande in vorangegangener Gel-Elektrophorese keine Konzentrationsbestimmung möglich)
- 38 µl H<sub>2</sub>O
  
- + 2,5 µl *Bsa*1 (10 U/µl)
- 3 Stunden bei 50 °C inkubieren
  
- + 1,5 µl *Bam*H1 (40U/l)
- 4 Stunden bei 37 °C inkubieren

Im Anschluss an die Restriktionshydrolyse erfolgte eine Auftrennung der Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.12.2.). Die im weiteren Verlauf benötigten Banden wurden unter einem UV-Transilluminator ausgeschnitten und in der anschließenden Gel-Extraktion in 20 µl eluiert. Anschließend erfolgt die Ligation (siehe 2.12.4.) in den pSUMO3-Expressionsvektor.

## 2.13. Rekombinante Expression von PFLG-3 und PFLG-4 in *Escherichia coli*

### 2.13.1. Struktur des Expressionsvektors

Die Expression von PFLG-3 und PFLG-4 wurde in *Escherichia coli* BL21(DE3)plysS-Zellen (Novagen/Merck, Darmstadt) durchgeführt. Hierfür wurde der pSUMO3-Vektor (5610bp, LifeSensors, Malvern, USA) verwendet. Dieser Vektor bietet die Möglichkeit, rekombinante Fusionsproteine mit N-terminalen Hexa-Histidin-Tags zu exprimieren, da sich am N-terminalen Ende des Vektors sechs aufeinanderfolgende CAT-Basensequenzen befinden,

die jeweils für Histidin kodieren. Diese Fusionstags ermöglichen die Aufreinigung der Fusionsproteine mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe 2.15.2.). Im Anschluss an die C8-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.3.) konnte dieser Fusionsabschnitt durch die SUMO Protease 2 (LifeSensors, Malvern, USA) abgespalten und somit das Fusionsprotein freigesetzt werden.

Der pSUMO3-Vektor trägt zudem eine T7-Promotorregion, über welche die Expression der pSUMO3-Fusionsproteine kontrolliert wird. Somit ist die Expression durch die T7-RNA-Polymerase der *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen möglich. Die Induktion dieser Polymerase erfolgte durch IPTG (siehe 2.13.2.3.).

Für die Erzeugung der DNA-Abschnitte für die Ligation in den pSUMO3-Vektor wurden pSUMO3-PFLG-3- bzw. PFLG-4-Primer (siehe 2.3.) verwendet, die den zu amplifizierenden Genabschnitt umspannen und zusätzlich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bsa*I und *Bam*HI enthalten. Weiterhin tragen die Primer die zum Überhang des Vektors am 5'-Ende (5'-TCCA-3') komplementäre Sequenz (5'-AGGT-3'), wodurch die Ligation (siehe 2.12.4.) in den Vektor ermöglicht wurde.

Der Vektor trägt zudem ein Gen für eine Kanamycin-Resistenz, die für die Selektion bei der Kultivierung der den pSUMO3-Vektor tragenden Bakterien von Bedeutung ist (siehe Tab. 2.2.), da auf einem Kanamycinhaltigen Nährmedium nur diejenigen Bakterien wachsen, die im Rahmen der Transformation (siehe 2.12.5.) den pSUMO3-Vektor aufgenommen haben.

### 2.13.2. Durchführung der Expression

Die Expression von PFLG-3 und PFLG-4 erfolgte in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen/Merck, Darmstadt). Dieser Zellstamm besitzt das Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Die T7-RNA-Polymerase transkribiert die klonierten Gene, welche im pSUMO3-Vektor unter Kontrolle des T7-Promotors stehen, nach der Induktion mit IPTG.

#### 2.13.2.1. Übernachtkulturen

Für die Übernachtkulturen wurden 3 ml Kanamycin- (50 µg/ml) und Chloramphenicolhaltiges (50µg/ml) LB-Medium mit einer Einzelkolonie *E. coli* BL21(DE3)pLysS mit den entsprechenden Vektoren angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 250 Upm und 37 °C inkubiert.

#### **2.13.2.2. Bestimmung der Bakteriendichte**

Zur Bestimmung der Bakteriendichte in den angeimpften Nährmedien wurde die optische Dichte in einem Spektrophotometer (Hitachi, Wiesbaden) bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen. Dies bot die Möglichkeit, eine definierte Menge Bakterien in den Übernachtskulturen animpfen zu können. Als Referenz diente das für die Anzucht verwendete LB-Kulturmedium. Für die Messung der  $OD_{600}$  wurden 100  $\mu$ l Kultur mit 900  $\mu$ l Medium verdünnt.

#### **2.13.2.3. Induktion und Zellkultivierung**

In je 250 ml LB-Medium mit Kanamycin, Chloramphenicol und Glukose wurden die Übernachtskulturen mit einer Ziel- $OD_{600}$  von 0,02 angeimpft. Bei regelmäßiger Kontrolle der  $OD_{600}$  erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Schüttler (200 Upm) bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 bis 0,6. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 500  $\mu$ l der angesetzten Proben mit 180  $\mu$ l Glycerin (87%) versetzt und bei –80 °C gelagert. Die anschließende Induktion der Expression der Fusionsproteine erfolgte mit 250  $\mu$ l IPTG (1 M). Nach weiteren drei Stunden der Inkubation unter den oben genannten Bedingungen wurden die Expressionskulturen zentrifugiert (5000 x g, 5 min, 4 °C). Nach Verwerfen der Überstände wurden die Zellpellets mit 2,5 ml LEW-Puffer (1x) durch Vortexen resuspendiert und bei –80 °C bis zur Aufreinigung von PFLG- 3 bzw. PFLG-4 aufbewahrt.

Zur Induktionskontrolle wurden Proben unmittelbar vor und 3 Stunden nach der Induktion entnommen (90/ gemessene  $OD_{600}$  ergab die erforderliche Probenmenge in  $\mu$ l), zentrifugiert (10000 x g, 5 min, 22 °C) und die Zellpellets bis zur Analyse mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.16.3.) bei –20 °C gelagert.

### **2.14. Proteolyse der exprimierten Fusionsproteine**

Da die exprimierten Proteine im pSUMO3-System als Fusionsprotein mit angehängtem Histidin-SUMO-Teil vorlagen, musste der Fusionsteil mittels der SUMO Protease 2 (LifeSensors, Malvern, USA) an der Tertiärstruktur erkannt und abgespalten werden. Für die Proteolyse wurden mittels C8-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.3.) aufgereinigte und anschließend lyophilisierte Proteine verwendet.

Es wurde folgender Ansatz verwendet:

- 100 µg Fusionsprotein
- 500 µl 1x PBS (siehe Materialliste)
- 2,5 µl 1M DTT (Sigma, Steinheim)
- 10 U SUMO Protease 2 (LifeSensors, Malvern, USA)

Um eine möglichst vollständige Proteolyse zu erzielen, wurde der Ansatz mit Aluminium-Folie abgedeckt und für 7 Tage bei 25 °C im Schüttler (300 Upm) inkubiert.

## 2.15. Chromatographische Aufreinigung von PFLG-3 / PFLG-4

### 2.15.1. Aufreinigung von rekombinantem PFLG-3 / PFLG-4

Zur Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine wurden die nach der Expression gewonnenen Zellpellets weiter verarbeitet. Zur Lyse der Zellen erfolgten drei aus je 10 min bei -80 °C und 10 min Inkubation im Wasserbad bei ca. 37 °C bestehenden Zyklen und eine Ultraschallbehandlung aus sieben Zyklen (je 30 s Ultraschall (Sonopuls, Bandelin Elektronik, Berlin) und 15 s Pause). Die anschließende Zentrifugation des Zelllysates erfolgte bei 12000 x g bei 4 °C für 45 Minuten. Der das Fusionsprotein enthaltende Überstand wurde steril filtriert (Porengröße 0,45 µm, Filtropur S 0.45, Sarstedt, Nümbrecht) und auf eine Nickel-Affinitätsäule (siehe 2.15.2.) aufgetragen. Durch Zugabe von zunächst 100 % Trifluoressigsäure und zur weiteren Titration 5 % Trifluoressigsäure wurde die von der Nickelsäule eluierte Probe auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestellt, um das Ausfallen der Proteine im Bereich der Elutionssäulen zu verhindern, und mittels C8-Umkehrphasen - HPLC (siehe 2.15.3.) weiter aufgereinigt. Die dabei gewonnenen Fraktionen wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie (siehe 2.16.2.) auf das Vorhandensein der rekombinanten Fusionsproteine untersucht. Positive Fraktionen wurden lyophilisiert und im Anschluss mit 500 µl 1 x PBS versetzt. Durch weitere Zugabe von PBS wurde auf eine Proteinkonzentration von ca. 1 µg/µl eingestellt. Die Spaltung der Fusionsproteine in die rekombinant exprimierten Proteine PFLG-3 und PFLG-4 sowie den Fusionstag (Human pSUMO3 Fusion Tag) erfolgte mittels Proteolyse (siehe 2.14.). Um die weitere Aufreinigung



mittels C4-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.4.) durchführen zu können, wurden die Proben mit Trifluoressigsäure erneut auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestellt. Durch eine weitere massenspektrometrische Analyse wurden die von der C4-Säule eluierten Fraktionen auf das Vorhandensein PFLG-3 und PFLG-4 überprüft. Nach Lyophilisation und Resuspension in H<sub>2</sub>O erfolgte ein letzter Schritt der Aufreinigung mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.5.). Dieser diente auch gleichzeitig der Bestimmung der Proteinmenge. Im Anschluss an die abschließende Untersuchung im Massenspektrometer erfolgte die Lyophilisation der Proben als Vorbereitung auf die Untersuchung ihrer antimikrobiellen Aktivität.

### 2.15.2. Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine mittels einer Nickel – Affinitätssäule wurden „Protino<sup>®</sup> Ni-TED packed columns“ (Macherey-Nagel, Düren) nach dem Protokoll des Herstellers (Macherey-Nagel, User Manual Protino<sup>®</sup> Ni-TED packed columns, April 2006/ Rev. 03) verwendet. Die im Fusionsprotein vorhandenen Polyhistidin-Sequenzen interagieren mit Nickelionen der Säulenmatrix, so dass das Fusionsprotein zunächst hier gebunden wurde, während die übrigen *Escherichia coli*-Proteine im Durchfluss vorlagen. Die Elution der Fusionsproteine von der Säule wurde mit 4 ml Elutionspuffer (siehe 2.5.) durchgeführt.

Im Anschluss wurde das Eluat als Vorbereitung für die weitere Aufreinigung mittels C8-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.3.) durch Zugabe von Trifluoressigsäure auf einen pH - Wert zwischen 2 und 3 eingestellt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert und der resultierende Überstand sterilfiltriert.

### 2.15.3. C8-Umkehrphasen-HPLC

Für die weitere Aufreinigung des eluierten Materials der Nickel-Affinitätssäule (siehe 2.15.2.) wurde eine SP 250/10 300-7 C8-HPLC-Säule (Macherey – Nagel, Düren) verwendet. Zur Trennung wurde ein Gradient von einem polaren Puffer A (0,1% Trifluoressigsäure in H<sub>2</sub>O) zu einem unpolaren Puffer B (0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril) durchlaufen. Die Flussrate betrug 3 ml/min, die Detektion erfolgte bei 215 nm. Nach Äquilibration der Säule mit 10 % Puffer B erfolgte das Auftragen der Proben. Der Gradient lief die ersten 5 Minuten bei dieser Konzentration, stieg in den 25 folgenden Minuten auf 60 % Puffer B an, um in den nächsten 5 min auf 100 % Puffer B anzusteigen. Abschließend folgten weitere 5 min 100 % Puffer B. Die Fraktionierung erfolgte manuell.

Die resultierenden Proteinfractionen wurden mittels massenspektroskopischer Analyse (siehe 2.16.2.) auf das Vorhandensein der rekombinanten Fusionsproteine überprüft. Anschließend wurde eine Protein-Konzentrationsbestimmung (siehe 2.16.1.) derjenigen Fraktionen durchgeführt, deren gemessene Masse mit der berechneten Masse der Fusionsproteine übereinstimmten. Zur weiteren Verwendung wurden jeweils 100 µg lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

### **2.15.4. C4-Umkehrphasen-HPLC**

Nach Hydrolyse des Fusionsproteins in Zielprotein und Fusionsteil (siehe 2.14.) wurde eine C4-Umkehrphasen-HPLC durchgeführt, um das Zielprotein von dem Fusionsteil sowie der Protease zu trennen. Dazu wurde der Versuchsansatz mit 5% Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestellt und anschließend bei 5000 x g für 5 min zentrifugiert. Die Auftrennung erfolgte über eine Bakerbond Jupiter 5U C4 300A-Säule (250 x 4,6 mm, Phenomenex, Aschaffenburg) mit Hilfe eines Gradienten aus Puffer A und B (siehe 2.5.). Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Proteine wurden über die Absorption ihrer Peptidbindungen bei 215 nm detektiert und manuell fraktioniert.

Nach 10 min Äquilibration mit 10 % Puffer B folgte ein linearer Gradient in 10 min auf 40 % Puffer B, ein weiterer linearer Gradient in 20 min auf 70% Puffer B. In weiteren 10 min erfolgte ein Gradient auf 100 % Puffer B, mit dem abschließend für weitere 5 min gespült wurde.

Anschließend wurde wiederum eine massenspektroskopische Analyse der Fraktionen durchgeführt (siehe 2.16.2.). Bei Übereinstimmung der gemessenen mit der berechneten Masse erfolgte im Anschluss eine Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.16.1.). Die jeweiligen Proteine wurden lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

### **2.15.5. C2/C18-Umkehrphasen-HPLC**

Als letzter chromatographischer Reinigungsschritt wurde eine C2/C18-Umkehrphasen-HPLC an einer „SMART™System“ – Anlage (Pharmacia, Freiburg) mit einer µRPC C2/C18 SC 2.1./10 Säule (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Dies ermöglichte zudem eine Bestimmung der Proteinmenge für den weiteren Einsatz der Proben in antimikrobiellen Tests.

Zur Elution wurde ein Gradient von Puffer A (0,1 % Trifluoressigsäure in H<sub>2</sub>O) zu Puffer B (0,1 % Trifluoressigsäure in 80 % Acetonitril) bei einer Flussrate von 100 µl/min eingesetzt. Die Äquilibration der Säule erfolgte mit 100 % Puffer A. Anschließend folgte ein linearer Gradient bis 25 % Puffer B innerhalb von 10 min, ein weiterer linearer Gradient bis zu 70 % Puffer B innerhalb weiterer 30 min und ein abschließender linearer Gradient bis zu 100 % Puffer B innerhalb von 10 min. Detektiert wurde bei 215, 254 bzw. 256 und 280 nm. Die Fraktionierung erfolgte manuell.

Durch Ermitteln der Fläche der einzelnen Peaks (Area [min x mAU (Height)]) konnte mittels Dreisatz-Rechnung die Proteinmenge näherungsweise bestimmt werden (550 min x mAU entsprechen etwa 10 µg Protein). Die zusätzliche Konzentrationsbestimmung mittels C2/C18 neben der photometrischen Bestimmung war nötig, da in PFLG-3 und PFLG-4 nur wenige aromatische Aminosäuren vorliegen, so dass eine ausreichend genaue photometrische Konzentrationsbestimmung für sich anschließende antimikrobielle Tests nicht möglich war.

## 2.16. Proteinanalytik

### 2.16.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die näherungsweise Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte durch Berechnung mittels des molaren Extinktionskoeffizienten. Diese Konzentrationsbestimmung ist notwendig, um die Bindungskapazität der HPLC-Säulen nicht zu überschreiten und damit Verluste der exprimierten Proteine zu vermeiden und um die nötige Proteinmenge für die sich an die C8-Umkehrphasen-HPLC anschließende Proteine zu ermitteln. Hierzu wurde eine Absorptionsmessung mit einem Einstrahlphotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde die Absorption der Proteinlösung in UV-Einmal-Kunststoffküvetten (Uvette<sup>®</sup>, Eppendorf, Hamburg) mit einer Schichtdicke von 1 cm gemessen. Bei Proteinen ist der molare Extinktionskoeffizient unter anderem abhängig von der Anzahl der vorhandenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin sowie der Ausbildung von Disulfid-Brücken. Der molare Extinktionskoeffizient lässt sich bei bekannter Sequenz der zu analysierenden Proteine mit Hilfe des Programms „ProtParam“ auf der Internetseite des ExPaSy Proteomic Servers (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) berechnen. Anschließend konnte die Konzentration der Proteine mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt werden. Dieses beschreibt, dass sich die Lichtextinktion bei einer bestimmten Wellenlänge proportional zur Konzentration der Lösung verhält, wenn die Schichtdicke der Lösung gleich bleibt:

$$E_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \cdot c \cdot d$$

$E_{280\text{ nm}}$ : Extinktion bei 280 nm;  $\epsilon_{280\text{ nm}}$ : molarer Extinktionskoeffizient in  $\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ;

c: Konzentration der Lösung in M; d: Schichtdicke der Küvette in cm.

Da sich in PFLG-3 und PFLG-4 nur wenige aromatische Aminosäuren befinden, reichte diese Vorgehensweise der Konzentrationsbestimmung lediglich aus, um eine grobe Abschätzung vorzunehmen; so beispielsweise für die C8-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.3.). Eine genauere Bestimmung war für den Einsatz einer definierten Menge PFLG-3 bzw. PFLG-4 bei den antimikrobiellen Tests (siehe 2.17.) notwendig. Aus diesem Grund wurde hier die Berechnung der Konzentration mittels C2/C18 (siehe 2.15.5.) vorgenommen, die unabhängig von der Anzahl der aromatischen Aminosäuren funktioniert.

### 2.16.2. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren zur exakten Massenbestimmung von Proteinen und beruht auf der Bestimmung freier Ionen im Hochvakuum. Das Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator sowie einem Detektor. In der Ionenquelle werden die Proteine ionisiert, im Massenanalysator werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Der Detektor dient dazu, die im Massenspektrometer getrennten Ionen zu zählen und in elektrische Signale umzusetzen.

Mittels der Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie an einem Quadrupol-Time-of-Flight-Hybrid Massenspektrometer (QTOF II, Micromass, Manchester, UK) im Positiv-Ionen-Modus erfolgte die Analyse von PFLG-3- bzw. PFLG-4-Proteinen, der pSUMO3-PFLG-3- bzw. PFLG-4-Fusionsproteine sowie des pSUMO3-Fusionstags. Rohdaten kombinierter Spektren wurden Hintergrund-korrigiert und die monoisotopischen Massen in Dalton über die „MaximumEntropy 1“ (MaxEnt1)-Dekonvolution der „MassLynxSoftware“ (Micromass, Manchester, UK) berechnet. Die berechneten Massen wurden dann mit Massendaten verglichen, die mittels des „ProtParam tool“ ermittelt wurden. Dieses ist über die Homepage des ExpASY (Expert Protein Analysis System; <http://www.expasy.org>) Proteomic Server des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) zugänglich.

### 2.16.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Nach der Aufreinigung der Proteine mittels HPLC (siehe 2.15.) erfolgte zur Kontrolle der Reinheit und Größe eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Für die Kontrolle der einzelnen Aufreinigungsschritte in der Produktion von PFLG-3 und PFLG-4 wurde das „Xcell sure lock Mini-Cell-Gelsystem“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Größenstandard wurde der Marker SeeBlue® Plus2 Standard (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Es wurden Trenngele zwischen 7 und 10 % eingesetzt.

Die Auftrennung erfolgte in einem 1fachen MES-SDS-Laufpuffer. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel im Anschluss an den Lauf für 2 h bei 37°C im Schüttler mit Coomassie-Färbelösung (siehe 2.5.) und anschließend mit einer Entfärbelösung (siehe 2.5.) bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes inkubiert. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrmalig gewechselt, um den Vorgang der Entfärbung zu beschleunigen.

Die Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue beruht vermutlich auf der direkten Bindung des Farbstoffs an die Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin (Olson und Markwell, 2007).

## 2.17. Antimikrobielle Testverfahren

Im Anschluss an die Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine PFLG-3 und PFLG-4 wurden diese hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Aktivität gegen den Gram-positiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, gegen die Gram-negativen Bakterienstämme *Escherichia coli* ATCC 11303 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 sowie den Hefepilz *Candida albicans* ATCC 24433 getestet. Dies erfolgte im radialen Plattendiffusionstest (siehe 2.17.1.). Dieser Test wurde freundlicherweise im Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, von Frau Silvia Voss durchgeführt.

### 2.17.1. Radialer Plattendiffusionstest

Beim radialen Plattendiffusionstest wurden die verschiedenen Mikroorganismen (siehe 2.10.) zunächst in 8 ml TSB-Medium angesetzt und bei 37°C über Nacht im Schüttler bei 120 Upm

inkubiert. Zudem erfolgt der Ansatz von Underlay und Overlay. Abhängig von der Bakterienkultur wurden von der Übernachtskultur verschiedene Volumina in 8 ml TSB-Medium aufgenommen und für 2 – 3,5 h stehend bzw. schüttelnd inkubiert; eine Übersicht zeigt Tab. 2.3..

Die Underlay-Agarose (1 % Agarose, 0,02 % Tween20, 1 % TSB-Medium, 10 mM Natriumphosphatpuffer) wurde verflüssigt und auf 46 °C gehalten. Anschließend wurden jeweils 10 ml des Underlays mit verschiedenen Volumina der Bakteriensuspensionen (siehe Tab. 2.3.) vermischt, in Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) gegossen sowie für 15 min bei Raumtemperatur und für 30 min im Kühlschrank ausgehärtet. In die Underlay-Agarose wurden mit einer Hautstanze Löcher mit einem Durchmesser von 3 mm gestanzt. In diese Löcher wurden jeweils 5 µl Testlösung gegeben, wobei die Proben in 0,01 % Essigsäure gelöst wurden. Über Nacht wurde bei 37° C inkubiert. Humanes Lysozym (0,1 mg in 100 µl 0,01% Essigsäure, Sigma L 8405, Sigma, Steinheim) wurde als Positivkontrolle, 0,01% Essigsäure wurden als Negativkontrolle verwendet.

In der Zwischenzeit wurde Overlay-Agarose (1 % Agarose, 3,4 % Caseinpepton, 0,6 % Sojamehlpepton, 0,5 % D+-Glukose-Monohydrat, 1 % NaCl, 0,5 % Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,2-7,4) verflüssigt und auf 46° C gehalten. Nach Inkubation der Underlay-Agarose wurde diese mit der Overlay-Agarose überschichtet. Nachdem diese ausgehärtet war, erfolgte eine erneute Inkubation über 3-4h bei 37° C. Dann konnten die Durchmesser der Hemmhöfe vermessen werden.

**Tab. 2.3.: Kultivierung der verschiedenen Mikroorganismen im Radialdiffusionstest**

Gattung	Überimpftes Volumen aus Übernachtskultur	Inkubation der Kultur bei 37 °C	Volumen in 10 ml Underlay
<i>Escherichia coli</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50 µl	Standkultur	50 µl
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 µl	Standkultur	100 µl
<i>Candida albicans</i>	200 µl	Schüttelkultur	200 µl

Im Anschluss an die Durchführung der radialen Plattendiffusionstests erfolgte die Berechnung der „Minimalen Effektiven Konzentration“ (MEK; Steinberg und Lehrer, 1997). Dazu wurden die 3 mm des gestanzten Probenloches von den Hemmhof-Werten abgezogen. Bei der anschließenden Umrechnung der Größe des tatsächlichen Hemmhofes in Einheiten entsprachen zehn Einheiten einem Millimeter. Im Anschluss wurden die Einheiten halblogarithmisch gegen die Konzentration der jeweiligen Probe aufgetragen. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszissen-Achse bezeichnet die MEK.

In Fällen, in denen antimikrobielle Aktivität nur bei einer 1:1 Verdünnung nachgewiesen werden kann, ist es nicht möglich, eine MEK zu ermitteln. Hier erfolgt die Auswertung anhand des Durchmessers der Hemmhöfe.

### 3. Ergebnisse

Obwohl gesunde menschliche Haut ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt ist, wird sie normalerweise nicht von diesen infiziert (Fitzpatrick et al., 1993). Eine wichtige Rolle im Rahmen dieser natürlichen Resistenz spielt die Produktion und Sezernierung von antimikrobiell wirksamen Proteinen durch Keratinozyten (Schröder, 1999). Im Rahmen von HPLC-Analysen von Stratum corneum konnten Fraktionen mit antimikrobieller Aktivität identifiziert werden, die N-terminale Abschnitte von Profilaggrin enthielten. Ziel dieser Arbeit war es, zwei dieser N-terminalen Abschnitte rekombinant zu exprimieren und hinsichtlich antimikrobieller Eigenschaften zu testen.

#### 3.1. Rekombinante Expression von PFLG-3 und PFLG-4 im pSUMO3-System

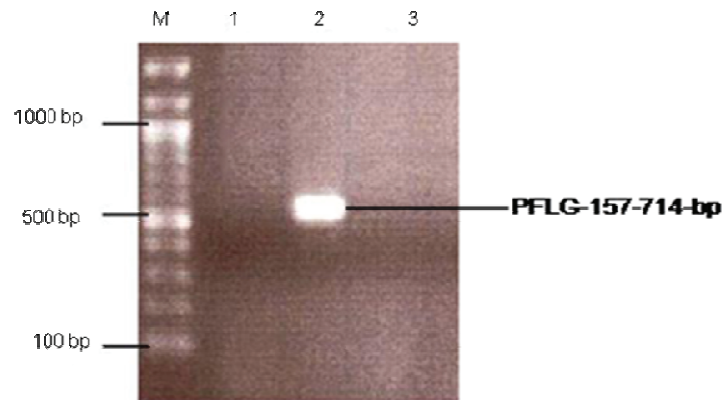
##### 3.1.1. Amplifizierung der PFLG-3- und PFLG-4-Gensequenzen mittels PCR

Die für die Amplifikation verwendete cDNA wurde aus ausdifferenzierten humanen Keratinozyten neonataler Vorhautepidermis gewonnen. Zunächst wurde ein Abschnitt der cDNA amplifiziert, welcher die Sequenzen von PFLG-3 und PFLG-4 einschließt. Mit den genspezifischen Primern PFLG-157bp-F sowie PFLG-714bp-R wurde somit ein etwa 550 bis 570 bp großes Fragment amplifiziert, welches der Länge des zu erwartenden Produktes (558 bp) entspricht. Das Ergebnis einer sich anschließenden elektrophoretischen Auftrennung zeigt Abb. 3.1. Die deutlichste Bande resultierte bei einer „Annealing“-Temperatur von 61 °C und dem Einsatz von 0,5 µl cDNA bei einem Gesamt-Ansatz von 20µl. Höhere „Annealing“-Temperaturen sowie eine größere (1,5 µl) oder kleinere Menge (0,05µl) von cDNA führten zu keinen sichtbaren Amplifikaten im Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel.

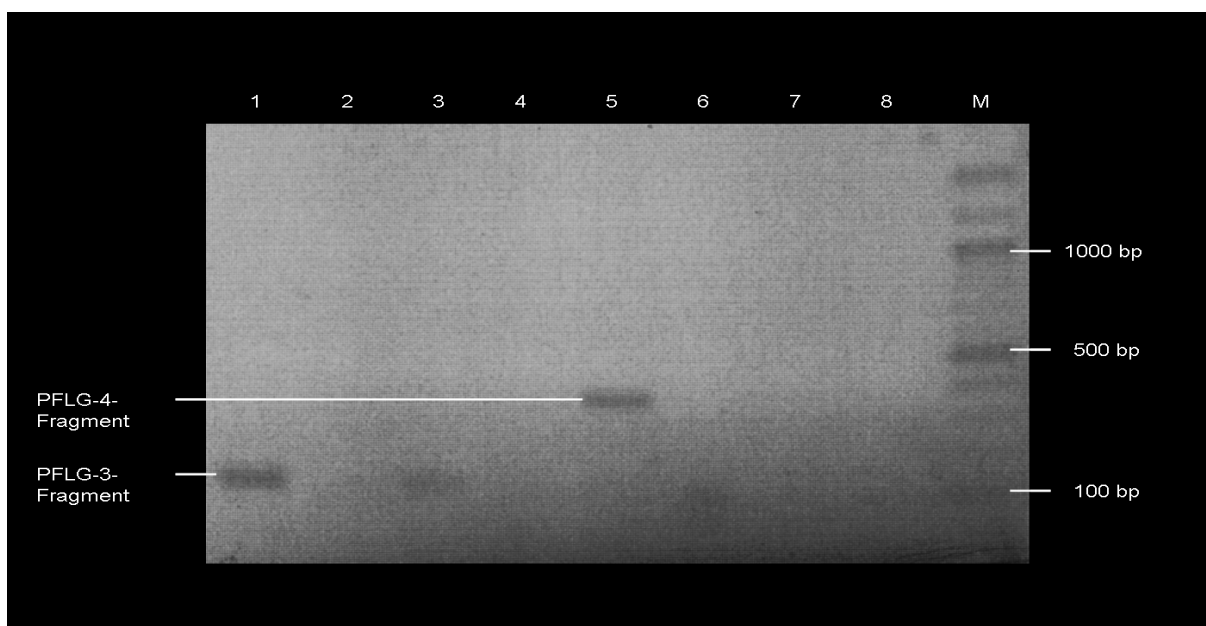
Im Anschluss an eine Gel-Extraktion (siehe 2.12.3.) wurde das oben beschriebene 558 bp große Fragment als Matrize in einer „Nested-PCR“ (siehe 2.12.1.2.) zur Amplifikation von PFLG-3 und PFLG-4 verwendet. Die hieraus resultierenden 122 bp (PFLG-3) bzw. 359 bp (PFLG-4) großen Fragmente wurden anschließend mit *Taq*-Polymerase inkubiert, um A-Überhänge zur späteren Ligation in den pGEM-T-Vektor zu generieren. Die Ergebnisse einer sich anschließenden elektrophoretischen Auftrennung sind in Abb. 3.2. gezeigt. Die



deutlichsten Banden wurden für beide Fragmente bei einer „Annealing“-Temperatur von 55° C erreicht. Bei Temperaturen von 58 °C resultierten keine Banden.

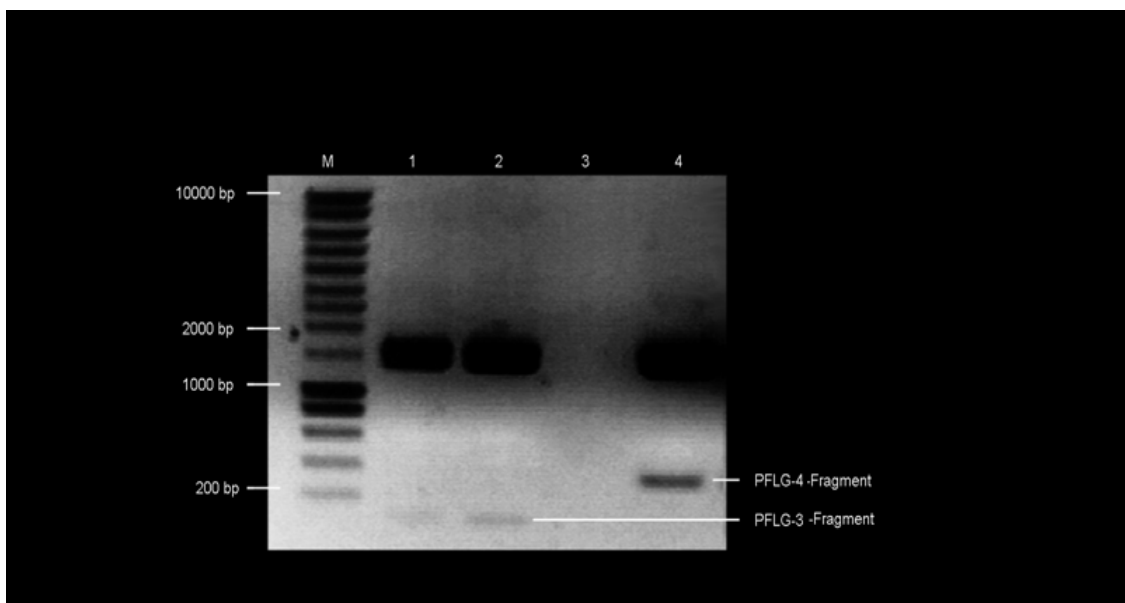


**Abb. 3.1.: Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung von mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten cDNA-Fragmenten (PFLG-157-714-bp).** Randständig wurde eine 100 bp-DNA-Größenstandard aufgetragen. In den Ansätzen der verschiedenen Lanes wurden cDNAs in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. 1: 0,5 µl cDNA (1:10); 2: 0,5 µl cDNA; 3: 1,5 µl cDNA. An Position 3 eine deutliche Bande bei etwa 550 bis 570 bp.



**Abb. 3.2.: Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung von mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten PFLG-3- und PFLG-4-Fragmenten.** Rechtsseitig wurde eine 100 bp-DNA-Größenstandard aufgetragen. In den Ansätzen der verschiedenen Lanes wurden für die PFLG-3- und PFLG-4-Primer verschiedene Annealing-Temperaturen getestet: 1: PFLG-3-Primer bei 55°C; 3: PFLG-3-Primer bei 58°C; 5: PFLG-4-Primer bei 55°C; PFLG-4-Primer bei 58°C; 2,4,6,8: Negativkontrollen. An Position 1 zeigt sich eine Bande bei etwa 110 bis 130 bp (entsprechend PFLG-3-Fragment). An Position 5 zeigt sich eine Bande bei etwa 350 bis 370 bp (entsprechend PFLG-4-Fragment).

Die resultierenden PCR-Produkte wurden nach einer weiteren Gel-Extraktion in den pGEM-T-Vektor ligiert (siehe 2.12.4.). Nach Transformation in *Escherichia coli* Top 10F' (siehe 2.12.5.), „Colony-Check-PCR“ (siehe 2.12.1.3.), Anzucht der *Escherichia coli*-Zellen in Flüssigmedium erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA (siehe 2.12.6.) aus den Bakterien. Anschließend wurde eine Restriktionshydrolyse der Plasmid-DNA durchgeführt (siehe 2.12.8.). Die Ergebnisse der folgenden elektrophoretischen Auftrennung zeigt Abb.3.3.. Die deutlichsten Banden resultierten aus dem Einsatz von 7 µl pGEM-T-Vektor (hier Zugabe der laut Versuchsprotokoll maximal möglichen Menge, da aufgrund sehr schwacher Bande in vorangegangener Gel-Elektrophorese keine Konzentrationsbestimmung möglich) bei einem 50 µl-Ansatz sowie einer Temperatur von 50 °C während der dreistündigen Inkubation mit *Bsa*I und von 37°C während der vierstündigen Inkubation mit *Bam*HI. Bei der Verwendung von geringeren Vektor-Mengen resultierten deutlich schwächere Banden nach der elektrophoretischen Auftrennung.



**Abb. 3.3.:Ethidiumbromid-gefärbte elektrophoretische Auftrennung nach Restriktionshydrolyse von Plasmid-DNA.** Linksseitig wurde ein Smart-DNA-Größenstandard aufgetragen. An Position 2 zeigt sich eine schwächere Bande bei etwa 110 bis 130 bp (entsprechend PFLG-3-Fragment). An Position 4 zeigt sich eine deutlichere Bande bei etwa 350 bis 370 bp (entsprechend PFLG-4-Fragment). Die kräftigen Banden in Position 1,2 und 4 bei etwa 1300 bis 1700 bp entsprechen dem pGEM-T-Vektor. 3: hier keine Probe aufgetragen.

Im Anschluss an eine weitere Gel-Extraktion wurden die aus der Restriktionshydrolyse resultierenden PFLG-Fragmente in den pSUMO3-Vektor ligiert (siehe 2.12.4.). Das weitere Vorgehen entspricht bis einschließlich der Isolation der Plasmid-DNA dem sich an die Ligation in den pGEM-T-Vektor anschließenden Ablauf (siehe oben). Von den isolierten

Proben wurden jeweils 5 µl Plasmid mit 2 µl T7-Term-Short-Primer versetzt und zum Sequenzieren an die Firma SeqLab (Sequence Laboratories, Göttingen) geschickt, wo eine „HotShot“-Sequenzierung (siehe 2.12.7.) durchgeführt wurde. Diese ergab sowohl für das PFLG-3-Insert als auch für das PFLG-4-Insert die korrekte Basenabfolge, so dass die entsprechenden Vektoren für die weiteren Schritte der Transformation und Expression verwendet werden konnten. Zur nachfolgenden Expression der PFLG-3- und PFLG-4-Fusionsproteine wurden die Plasmide mit der richtigen Sequenz in *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS Bakterien transformiert (siehe 2.12.5.).

#### 3.1.2. Expression der Fusionsproteine

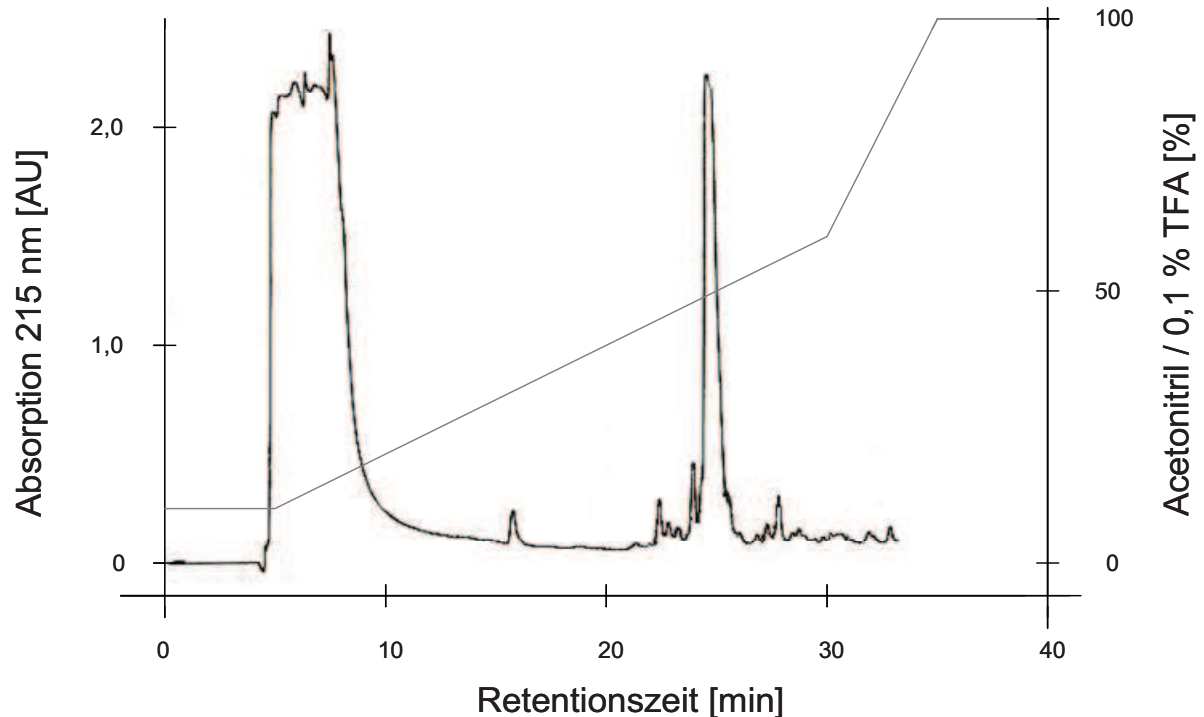
Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLysS Bakterien nach Induktion mit IPTG (1 M). Um die Zellen zu lysieren, wurden drei Zyklen durchgeführt, die jeweils aus 10minütiger Inkubation bei -80 °C und 10minütiger Inkubation im etwa 37 °C warmen Wasserbad bestanden. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung (siehe 2.15.1.). Nach 45minütiger Zentrifugation der Probe wurde die Trennung der Bakterien (Pellet) von dem sich im Überstand befindlichen Fusionsprotein erreicht.

#### 3.2. Aufreinigung von PFLG-3 und PFLG-4

Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurde der Überstand der Zentrifugation auf eine immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe 2.15.2.) aufgetragen. In dem resultierenden Eluat wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.16.1.), um in dem nachfolgenden Schritt der C8-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.3.) die Bindungskapazität der HPLC-Säulen nicht zu überschreiten. Pro HPLC-Lauf sollte daher nicht mehr als 1 mg Protein aufgetragen werden.

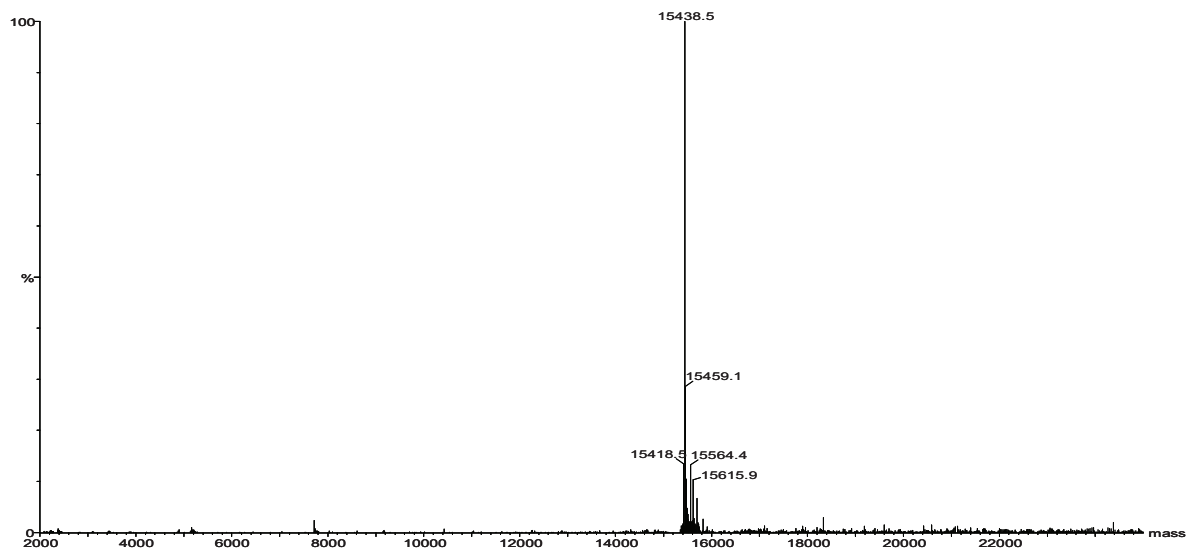
Die C8-Umkehrphasen-HPLC diente dazu, die Probe weiter aufzureinigen, und somit ein sauberes Fusionsprotein zu gewinnen. Weiterhin bietet die C8-Umkehrphasen-HPLC die Möglichkeit die Proben umzupuffern. Dies ist notwendig, da die für den Verdau der Fusionsproteine verwendete SUMO Protease 2 nicht im Imidazol-Puffer des Elutionspuffers der immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (siehe 2.15.2.) wirksam ist. Abb. 3.4. zeigt ein typisches Chromatogramm einer solchen C8-Umkehrphasen-HPLC. Nach etwa 4 bis 7 min zeigte sich ein deutlicher Einspritzpeak, der aus der hohen Imidazol-

Konzentration resultiert. Das Fusionsprotein wurde nach etwa 24 Minuten (sowohl für PFLG-3 als auch PFLG-4) eluiert.



**Abb. 3.4.: Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten PFLG-3-Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC.** Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Die Konzentration des Eluenten ist rechtsseitig aufgetragen. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 3 ml/min auf die C8-Säule aufgetragen und mit einem  $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{Acetonitril}/0,1\%\text{ Trifluoressigsäure}$ -Gradienten eluiert (siehe 2.15.3.).

In der massenspektrometrischen Auswertung (siehe 2.16.2.) wurde eine Masse von 15438,5 Da (siehe Abb. 3.5.) bzw. 15438,6 Da für das PFLG-3-Fusionsprotein errechnet. Die theoretisch berechnete Masse liegt bei 15438,0 Da. Für PFLG-4 ergaben sich in der massenspektrometrischen Auswertung Werte von 24682,7 Da (siehe Abb. 3.10.) bzw. 24683,0 Da bei einer theoretisch berechneten Masse von 24682,0 Da. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl das PFLG-3- als auch das PFLG-4-Fusionsprotein in korrekter Form vorlag.

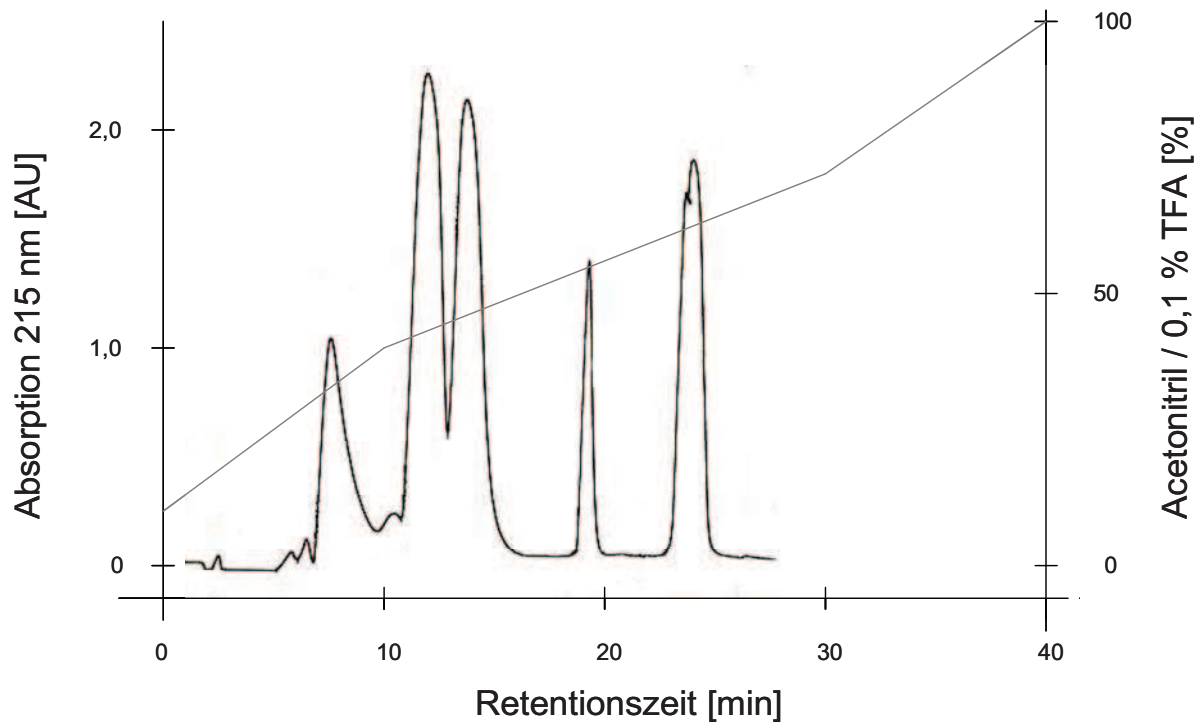


**Abb. 3.5.: Massenbestimmung von pSUMO3-PFLG-3-Fusionsprotein mittels QTOF-Massenspektrometrie.** Gezeigt ist die MaxEnt1-Auswertung einer Messung von mittels C8-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigtem pSUMO3-PFLG-3-Fusionsprotein. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks ist hier gegen die berechnete Masse (mass) in Da aufgetragen. Es wurde eine Masse von 15438,5 Da berechnet.

Das mittels C8-Umkehrphasen-HPLC isolierte Fusionsprotein wurde in einem nachfolgenden Schritt durch Hydrolyse (siehe 2.14.) proteolytisch gespalten. Durch Zugabe der SUMO Protease 2 erfolgte die Abspaltung des Fusionstags von PFLG-3 und PFLG-4. Ein anfänglich durchgeführter Versuchsansatz für 4 Tage mit 10 U SUMO Protease 2 bei einer eingesetzten Proteinmenge von 100 µg resultierte in einer deutlich unvollständigen Hydrolyse. Eine Steigerung auf 7 Tage brachte geringfügig verbesserte Ergebnisse, eine weitere Steigerung auf 11 Tage ergab keine weitere Verbesserung. Ebenso resultierten aus einer Steigerung der eingesetzten SUMO Protease 2 - Menge keine besseren Ergebnisse. Wichtig scheint hier, den Versuchsansatz mit einer Aluminium-Folie zu bedecken. Hieraus resultierte eine weitere Steigerung der hydrolysierten Anteile, wenn auch keine vollständige Hydrolyse. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, in vorangegangenen Ansätzen nicht hydrolysierte Fusionsproteine in einem neuen Ansatz zumindest teilweise zu hydrolysieren.

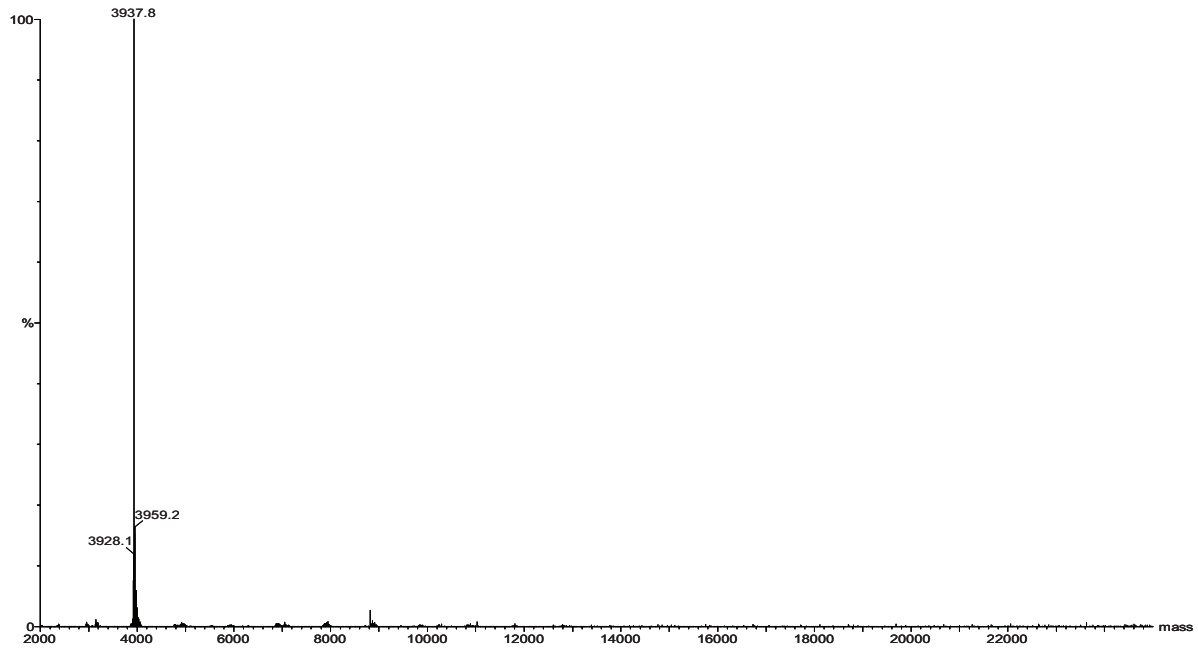
Im Anschluss an die Hydrolyse wurde eine C4-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.4.) durchgeführt, um PFLG-3 und PFLG-4 vom Fusionsprotein sowie vom Fusionstag zu trennen. Ein typisches Chromatogramm ist in Abb. 3.6. dargestellt. Die Peaks bei einer Retentionszeit von etwa 11 min bzw. bei PLFG-3 auch von etwa 13 min kommen durch das bei der Hydrolyse eingesetzte DTT in reduzierter und oxidiert Form zustande. Der Peak bei

einer Retentionszeit von etwa 19 Minuten beinhaltete PFLG-3 bzw. PFLG-4. Das jeweilige Fusionsprotein wurde bei einer Retentionszeit von etwa 23 Minuten eluiert, dieser Peak ging zumeist in den Peak des Fusionstags bei einer Retentionszeit von etwa 24 Minuten über. Der Lauf wurde nach etwa 28 min abgebrochen, da in vorangegangenen Läufen keine weiteren Fraktionen nach diesem Zeitpunkt eluiert wurden.



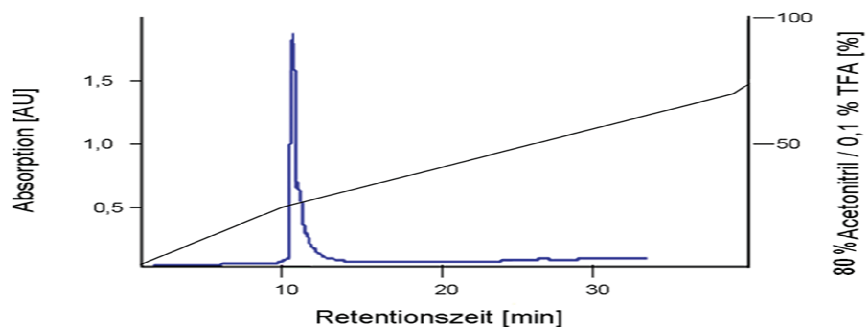
**Abb. 3.6.: Chromatogramm der Aufreinigung der SUMO Protease 2-behandelten Proben des PFLG-3-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC.** Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Die Konzentration des Eluenten ist rechtsseitig aufgetragen. Die Probe wurden mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen und mit einem  $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{TFA}-80\%\text{Acetonitril}/0,1\%$  Trifluoressigsäure-Gradienten eluiert. Der Lauf wurde nach etwa 28 min abgebrochen, da in vorangegangenen Läufen keine weiteren Fraktionen nach diesem Zeitpunkt eluiert wurden. Der Peak bei etwa 19 Minuten beinhaltete PFLG-3.

Bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse ergab sich eine Masse von 3937,8 Da (siehe Abb. 3.7.) bzw. 3937,6 Da für PFLG-3. Die theoretisch berechnete Masse ergibt einen Wert von 3937,2 Da. Die massenspektrometrische Analyse von PFLG-4 ergab zweimalig Massen von 13182,3 Da (siehe Abb. 3.12.) für PFLG-4. Bei einer theoretisch berechneten Masse von 13181,2 Da konnte davon ausgegangen werden, dass sowohl PFLG-3 und PFLG-4 in korrekter Form vorlag.



**Abb. 3.7.: Massenbestimmung von PFLG-3-Protein mittels QTOF-Massenspektrometrie.** Gezeigt ist die MaxEnt1-Auswertung einer Messung von mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigtem pSUMO3-PFLG-3-Protein nach proteolytischer Abspaltung des Fusionstags mittels SUMO Protease 2. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks ist hier gegen die berechnete Masse (mass) in Da aufgetragen. Es wurde eine Masse von 3937,8 Da berechnet.

Der letzte Reinigungsschritt von PFLG-3 und PFLG-4 erfolgte mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC (siehe 2.15.5.). Hier können jeweils 200-300 µg pro HPLC-Lauf auf die Säule aufgetragen werden. Die Abb. 3.8. zeigt beispielhaft einen C2/C18-HPLC-Lauf.



**Abb. 3.8.: Chromatogramm einer C2/C18-Umkehrphasen-HPLC des mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten PFLG-3-Proteins.** Gezeigt ist die Darstellung der Absorption in AU bei 215 nm. Die Konzentration des Eluenten ist rechtsseitig aufgetragen. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 0,1 ml/min auf die C2/C18-Säule aufgetragen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1 %TFA-80%Acetonitril/ 0,1 % Trifluoressigsäure-Gradienten eluiert.



Sowohl PFLG-3 als auch PFLG-4 eluieren bei einer Retentionszeit von etwa 13 Minuten. Die aufgereinigten Proteine wurden im Anschluss hinsichtlich möglicher antimikrobieller Aktivität getestet.

### 3.3. Antimikrobielle Aktivität von PFLG-3 und PFLG-4 im Radialen Plattendiffusionstest

Nach erfolgreicher Expression, Isolierung und Aufreinigung von PFLG-3 und PFLG-4 wurden diese Proteine im Rahmen von radialen Plattendiffusionstests (siehe 2.17.1.) auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht. Bei diesem Testsystem wurden Agaroseplatten verwendet, die den jeweils zu testenden Mikroorganismus bereits enthielten. Die in die Agarose ausgestanzten Löcher wurden mit Proteinlösungen von PFLG-3 und PFLG-4 in verschiedenen Verdünnungen gefüllt (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100), um eine Wirkschwelle feststellen zu können. Die 1:1-Verdünnung entspricht dabei einer Konzentration von 1 µg/µl. Jede Verdünnung wurde dabei in 3 Parallelansätzen getestet. Zeitgleich wurden Positivkontrollen mit Lysozym durchgeführt. Die Ergebnisse der verschiedenen Verdünnungen wurden für die Berechnung der „Minimalen Effektiven Konzentration“ (MEK) nach Steinberg und Lehrer, 1997, genutzt. In Fällen, in denen nur bei einer 1:1 Verdünnung Hemmhöfe abzugrenzen waren, war keine Berechnung der MEK möglich. Hier erfolgte die Auswertung anhand der Durchmesser der gemessenen Hemmhöfe. Im Rahmen dieser Tests wurden folgende Mikroorganismen eingesetzt: der Gram-positive Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, die Gram-negativen *Escherichia coli* ATCC 11303 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, sowie die Hefe *Candida albicans* ATCC 24433.

#### 3.3.1. Antimikrobielle Aktivität von PFLG-3

Im radialen Plattendiffusionstest (siehe 2.17.1.) zeigte sich für PFLG-3 gegen keinen der getesteten Mikroorganismen eine antimikrobielle Aktivität. Weder bei den Ansätzen mit *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 noch mit *Candida albicans* ATCC 24433 konnte ein Hemmhof abgegrenzt werden. Dies gilt für alle eingesetzten Verdünnungen (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100). Lediglich die Positivkontrolle unter Verwendung von Lysozym (100 ng/µl) zeigte bei allen getesteten Mikroorganismen deutlich abgrenzbare Hemmhöfe. Die beschriebenen Testergebnisse im Überblick zeigt Tab. 3.1.



Tab. 3.1.: Antimikrobielle Aktivität von PFLG-3 im Radialen Plattendiffusionstest in verschiedenen Verdünnungen.

Verdünnungen PFLG-3	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145		<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	
	H	B	H	B	H	B	H	B
1:1	kH		kH		kH		kH	
1:3	kH		kH		kH		kH	
1:10	kH		kH		kH		kH	
1:30	kH		kH		kH		kH	
1:100	kH		kH		kH		kH	
pos. K.	6		7		5		7	

H: Hemmhof, Durchmesser in mm; kH: kein Hemmhof abzugrenzen; B: Bewertung bei nicht vorhandenen Hemmhöfen nicht möglich; pos. K.: Postivkontrolle: humanes Lysozym 100 ng/µl. Bei keinem der Tests zeigte sich eine antimikrobielle Aktivität. Alle dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Tests. Die 1:1-Verdünnung entspricht dabei einer Konzentration von 1 µg/µl.

### 3.3.2. Antimikrobielle Aktivität von PFLG-4

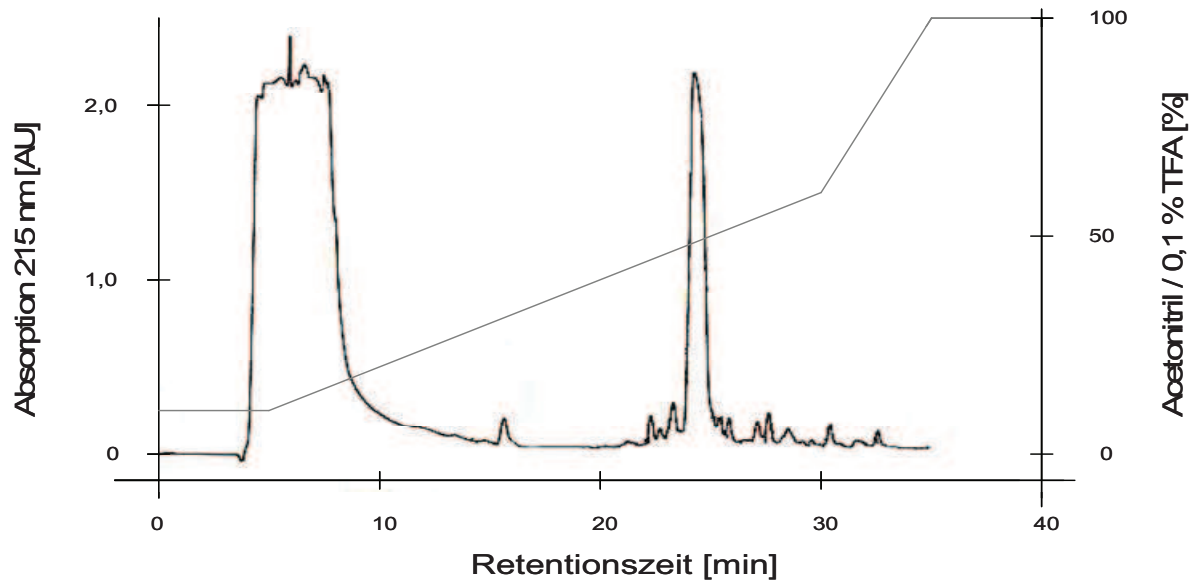
Im Radialen Plattendiffusionstest konnte für PFLG-4 antimikrobielle Aktivität gegen alle getesteten Mikroorganismen nachgewiesen werden. Sollte ursprünglich für alle getesteten Mikroorganismen die Minimale Effektive Konzentration (MEK) nach Steinberg und Lehrer, 1997 (siehe 2.17.1.), berechnet werden, war dies nur für *Escherichia coli* ATCC 11303 möglich, da nur hier Hemmhöfe in verschiedenen Verdünnungen auszumessen waren. Es ergab sich eine MEK von 51,7 µg/ml. Für alle anderen Mikroorganismen erfolgt die Auswertung anhand der Durchmesser der Hemmhöfe im Vergleich mit der Positivkontrolle, bei der humanes Lysozym in einer Konzentration von 500 ng/µl eingesetzt wurde. Für *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 zeigte sich bei einer 1:1 Verdünnung (1µg/µl) ein deutlich abgrenzbarer Hemmhof mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 4,4 mm (Positivkontrolle: 6mm). Im Rahmen der Tests gegen *Candida albicans* zeigte sich bei einer 1:1 Verdünnung (1µg/µl) ebenfalls ein deutlich abgrenzbarer Hemmhof mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 4,7 mm (Positivkontrolle: 7mm). Aus den 3 durchgeführten Parallelansätzen mit *Pseudomonas aeruginosa* resultierte bei 1:1 Verdünnungen (1µg/µl) nur in zwei Ansätzen ein messbarer Hemmhof mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 3,8 mm (Positivkontrolle: 5 mm), bei einer Verdünnung von 1:3 (0,33µg/µl) ergab sich in nur einem Ansatz ein messbarer Hemmhof mit einem Durchmesser von 3,5 mm. Damit war es hier ebenfalls nicht möglich, eine MEK zu berechnen. Bei 1:10 Verdünnungen (0,1µg/µl) resultierte sowohl bei den Ansätzen mit *Escherichia coli* ATCC 11303 als auch mit *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 bei jeweils einem der drei Ansätze ein deutlich abgrenzbarer Hemmhof. Dieser war allerdings nicht auszumessen. Die beschriebenen Ergebnisse im Überblick zeigt Tab. 3.2.

**Tab. 3.2.: Antimikrobielle Aktivität von PFLG-4 im Radialen Plattendiffusionstest in verschiedenen Verdünnungen**

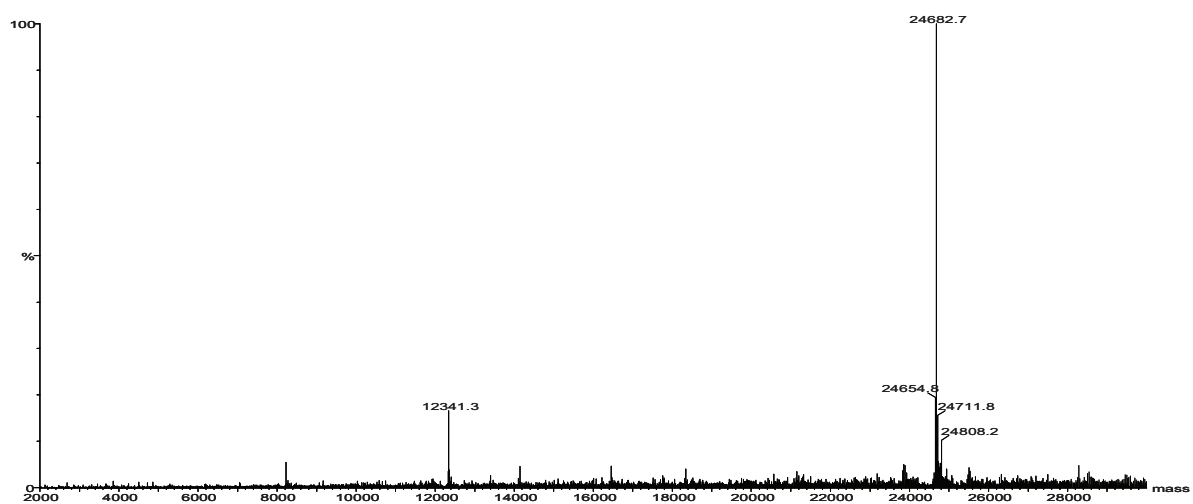
Verdünnungen PFLG-4	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145		<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	
	H	B	H	B	H	B	H	B
1:1	4,4	HHHH	6,7	HHHH	3,8**	HHHH	4,7	HHHH
1:3	kH		4,2	HHHH	3,5*	HHH	kH	
1:10	kH			HHH*		HHH*	kH	
1:30	kH		kH		kH		kH	
1:100	kH		kH		kH		kH	
pos. K.	6		7		5		7	

H: Hemmhof, Durchmesser in mm; kH: kein Hemmhof abzugrenzen; B: Bewertung der Hemmhöfe – HHHH: abgrenzbarer Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof; HHH: abgrenzbarer Hemmhof, kein Wachstum im Hemmhof, Hemmhof nicht messbar; pos. K.: Postivkontrolle: humanes Lysozym 500 ng/µl. Außer durch Sternchen markierte Werte (\*: Einzelwerte, \*\*: Doppelwerte) handelt es sich bei den dargestellten Ergebnissen um Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Tests. Die 1:1-Verdünnung entspricht dabei einer Konzentration von 1µg/µl.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Aufreinigung von PFLG-4 dargestellt.

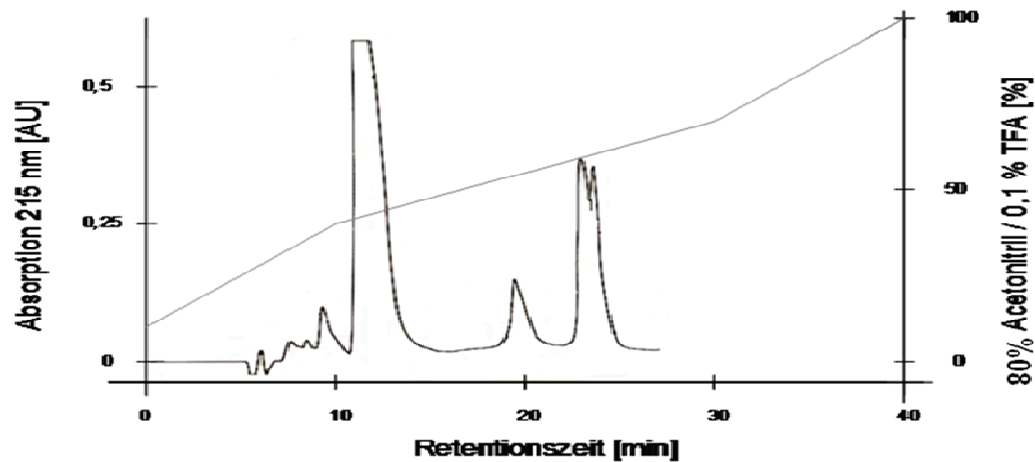


**Abb. 3.9.: Chromatogramm der Auftrennung eines rekombinant exprimierten PFLG-4-Fusionsproteins mittels C8-Umkehrphasen-HPLC.** Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Die Konzentration des Eluenten ist rechtsseitig aufgetragen. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 3 ml/min auf die C8-Säule aufgetragen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1%Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure-Gradienten eluiert. Der Peak bei etwa 24 Minuten beinhaltete das PFLG-4-Fusionsprotein.

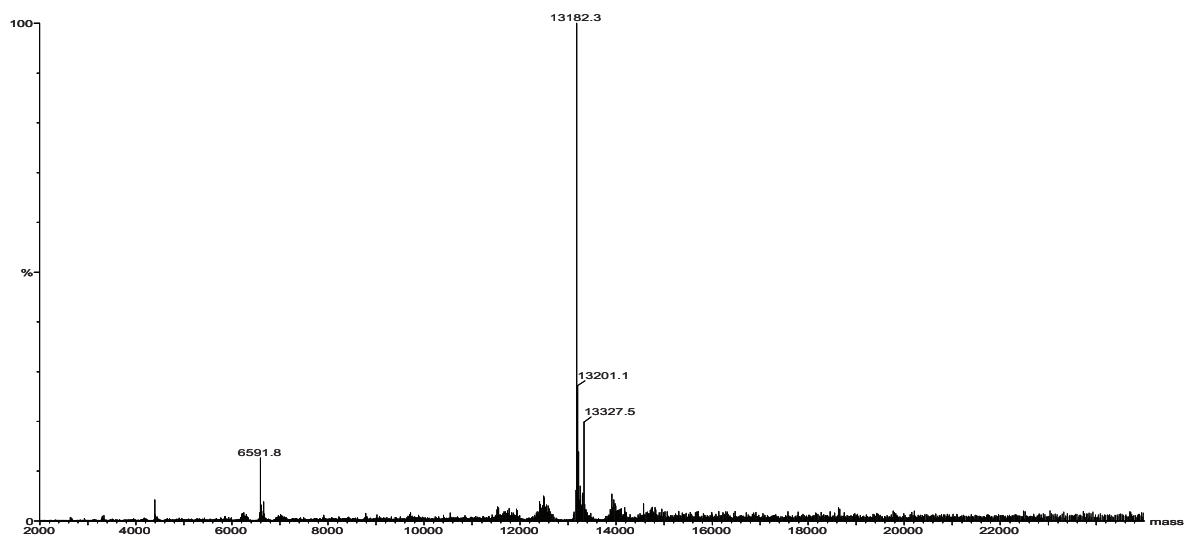


**Abb. 3.10.: Massenbestimmung von pSUMO3-PFLG-4-Fusionsprotein mittels QTOF-Massenspektrometrie.** Gezeigt ist die MaxEnt1-Auswertung einer Messung von mittels C8-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigtem pSUMO3-PFLG-4-Fusionsprotein. Die Intensität in Prozent des

höchsten Peaks ist hier gegen die berechnete Masse (mass) in Da aufgetragen. Es wurde eine Masse von 24682,7 Dalton berechnet.

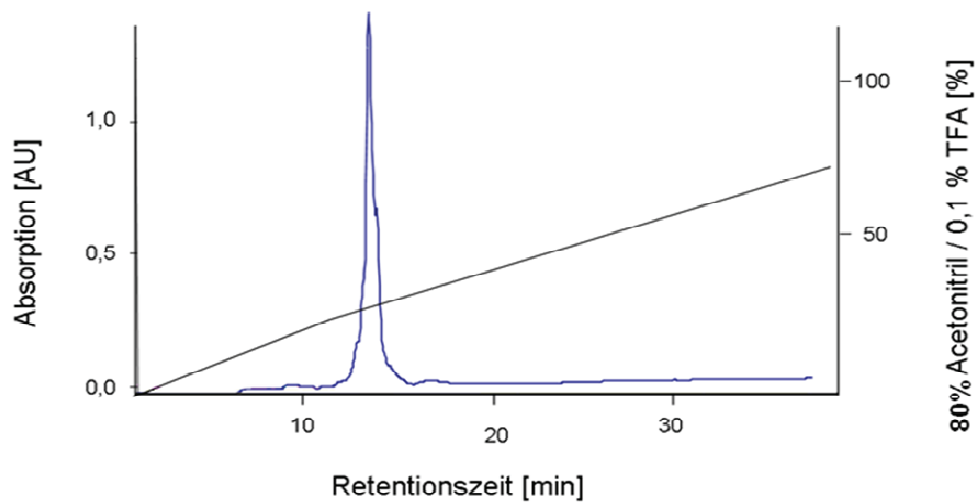


**Abb. 3.11.:** Chromatogramm der Aufreinigung der SUMO Protease 2-behandelten Proben des PFLG-4-Fusionsproteins mittels C4-Umkehrphasen-HPLC. Gezeigt ist die relative Absorption in AU bei 215 nm (schwarze Linie) im Gradientenverlauf (graue Linie). Die Konzentration des Eluenten ist rechtsseitig aufgetragen. Die Probe wurden mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die C4-Säule aufgetragen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1%Trifluoressigsäure-80%Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure-Gradienten eluiert. Der Peak bei etwa 19 Minuten beinhaltete PFLG-4.



**Abb. 3.12.:** Massenbestimmung von PFLG-4-Protein mittels QTOF-Massenspektrometrie. Gezeigt ist die MaxEnt1-Auswertung einer Messung von mittels C4-Umkehrphasen-HPLC

aufgereinigtem PFLG-4-Protein nach proteolytischer Abspaltung des Fusionstags mittels SUMO Protease 2. Die Intensität in Prozent des höchsten Peaks ist hier gegen die berechnete Masse (mass) in Da aufgetragen. Es wurde eine Masse von 13182,3 Dalton berechnet.



**Abb. 3.13.: Chromatogramm einer C2/C18-Umkehrphasen-HPLC des mittels C4-Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten PFLG-4-Proteins.** Gezeigt ist die Darstellung der Absorption in AU bei 215 nm. Die Konzentration des Eluenten ist rechtsseitig aufgetragen. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 0,1 ml/min auf die C2/C18-Säule aufgetragen und mit einem H<sub>2</sub>O/0,1 %Trifluoressigsäure-80%Acetonitril/ 0,1 % Trifluoressigsäure-Gradienten eluiert.

## 4. Diskussion

Als große Kontaktfläche zur Umwelt ist die menschliche Haut ständig einer Vielzahl von Bakterien, Viren und Pilzen und damit potentiellen Krankheitserregern ausgesetzt. Dennoch treten bei gesunden Menschen nur selten Hautinfektionen auf (Fitzpatrick et. al., 1993). In den letzten Jahren konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass die Haut neben ihrer physikalischen Barriere und ihrem „Säureschutzmantel“ (pH ca. 5,0) mit der Produktion von Effektormolekülen über weitere Abwehrmechanismen gegen das Eindringen von Mikroorganismen verfügt (Harder et al., 1997; Ganz und Lehrer, 1998; Sahly et al., 2003; Gläser et al., 2005).

Zu diesen Effektormolekülen gehören die antimikrobiellen Peptide. Bei den antimikrobiellen Peptiden handelt es sich vorwiegend um kleinere (3–5 kDa), kationische Peptide, deren Bildung in Epithelzellen sowie Zellen des Immunsystems erfolgt (Hancock und Diamond, 2000). Sie töten Mikroorganismen oder hemmen sie in ihrem Wachstum und werden dem angeborenen, unspezifischen Immunsystem zugerechnet. Sie können zudem zelluläre Mechanismen der adaptiven Immunabwehr aktivieren und ermöglichen damit eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Braff et al., 2005). Bisher können die meisten antimikrobiellen Peptide vier verschiedenen Gruppen zugeordnet werden: den Defensinen, den Cathelicidinen, den Ribonukleasen und den S100-Proteinen. Beispiele für bereits identifizierte antimikrobielle Peptide der Haut sind die humanen Beta-Defensinen 1, 2 und 3 und Psoriasin (Fulton et al., 1997; Harder et al., 1997; Harder et al., 2001; Gläser et al., 2005).

Untersuchungen von Proteinextrakten des Stratum corneum gesunder Menschen nach Auftrennung durch HPLC zeigten neben den drei dominierenden antimikrobiellen Proteinen RNase-7, Psoriasin und Lysozym weitere Proteine und Peptide, die auf antimikrobielle Eigenschaften untersucht wurden. So konnten bei weiteren HPLC-Analysen von Stratum corneum-Extrakten in antimikrobieller Aktivität enthaltenden Fraktionen Peptide identifiziert werden, die der N-terminalen Region von Profilaggrin zuzuordnen sind. Zusätzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe für Fragmente der „S100 Fused Type“-Proteine Hornerin und Ifapsoriasin antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden (Wu, 2005; Hansmann, 2009 ). Diese Befunde ließen vermuten, dass auch das quantitativ dominierende „S100 Fused Type“-Protein der Haut Profilaggrin antimikrobielle Aktivität aufweisen könne. Im Rahmen dieser Dissertation sollte nun den Fragen nachgegangen werden, ob sich die N-terminal lokalisierten Profilaggrin-Fragmente PFLG<sub>91-122</sub> (PFLG-3) und PFLG<sub>87-197</sub> (PFLG-4) in *Escherichia coli* exprimieren lassen und ob diese Fragmente antimikrobielle Eigenschaften aufweisen.

#### 4.1. PFLG-3 und PFLG-4 lassen sich in *Escherichia coli* rekombinant exprimieren

Für die Testung von PFLG-3 und PFLG-4 auf antimikrobielle Eigenschaften wurde versucht, diese Proteine rekombinant in *Escherichia coli* zu exprimieren. *E. coli*-Bakterien wurden hier ausgewählt, da sie aufgrund ihrer einfachen Kultivierbarkeit und ihrer schnellen Wachstumsrate bei einer Verdopplungszeit von ca. 20 Minuten für die rekombinante Expression von Proteinen in besonderem Maße geeignet sind (Sambrook et al., 1989).

Bei der Expression in *Escherichia coli* muss allerdings ein wichtiger Punkt berücksichtigt werden: Der Versuch der Expression vieler antimikrobieller Peptide scheiterte. Als möglicher Grund ist die hohe Aktivität dieser Peptide gegen *Escherichia coli* zu nennen (Valore und Ganz, 1997). Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das pSUMO3-Expressionssystem eingesetzt, um die gewünschten Proteine zunächst als Fusionsproteine, d. h. als Proteine mit angehängtem Fusionstag, zu exprimieren, deren antimikrobielle Aktivität gegenüber dem alleinigen Protein PFLG-3 bzw. PFLG-4 deutlich herabgesetzt ist. Weitere Vorteile sind eine erhöhte Proteinsynthese und eine einfach durchzuführende Aufreinigung des Proteins (Butt et al., 2005). Diese wird ermöglicht durch die im Fusionstag befindliche Polyhistidin-Sequenz, welche einen Reinigungsschritt mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie ermöglicht. Nachteil dieses Expressionssystems ist der zusätzlich notwendige Schritt der Abspaltung des Fusionstags (Butt et al., 2005). Unter Verwendung dieses Systems ließen sich PFLG-3 und PFLG-4 exprimieren.

Dennoch gab es einige Punkte, die es im Rahmen der sich anschließenden Aufreinigung besonders zu beachten galt, da sie zu Proteinverlusten führten und daher im Folgenden diskutiert werden sollen. Die sich an die Aufreinigung über die C8-Umkehrphasen-HPLC anschließende Proteolyse des Fusionsproteins mittels SUMO Protease 2 fand stets nur unvollständig statt; in der folgenden C4-Umkehrphasen-HPLC ließen sich sowohl für PFLG-3 und PFLG-4 stets Reste der unverdauten Fusionsproteine nachweisen. Dass diese unvollständigen Spaltungen auf unzureichende Versuchsbedingungen zurückzuführen sind, ließ sich weitestgehend ausschließen. Weder der Einsatz größerer Mengen der SUMO Protease 2, Veränderungen im Bereich der Lagerung (schüttelnd/statisch), noch veränderte Mengen des eingesetzten PBS in Relation zur Menge des Fusionsproteins erhöhten den Anteil der gespaltenen Fusionsproteine. Eine Verlängerung der Inkubationsdauer auf bis zu sieben Tage sowie eine Senkung der vom Hersteller empfohlenen Temperatur von 30 °C auf 25 °C sowie das Abdecken der Reaktionsansätze mit Aluminium-Folie führten zu einer etwas besseren, aber immer noch unvollständigen Spaltung. Eine weitere Steigerung der



Inkubationsdauer erbrachte keine weitere Verbesserung. Eine mögliche Erklärung für die unvollständigen Spaltungen liegt in der Funktionsweise der verwendeten SUMO Protease 2 begründet: Der SUMO-Fusionstag wird aufgrund seiner Tertiärstruktur und nicht aufgrund von Aminosäuresequenzen durch die SUMO Protease 2 erkannt und abgespalten (Malakhov et al., 2004). Möglicherweise bewirkt der PFLG-3- und PFLG-4-Anteil des Fusionsproteins eine Konformationsänderung der Tertiärstruktur im Bereich des Fusionstags, so dass aufgrund der sterischen Anordnung des Moleküls die Schnittstelle verdeckt sein und von der Protease nicht erkannt werden könnte.

Wie bereits oben erwähnt, konnte durch Abdunkeln der Reaktionsansätze der Proteolyse mit Aluminium-Folie der Anteil der Spaltprodukte der Fusionsproteine gesteigert werden. In diesem Zusammenhang scheint die Rolle von DTT von Bedeutung zu sein: Bei DTT handelt es sich um ein Reduktionsmittel, das freie SH-Gruppen vor Oxidation schützt und somit die Ausbildung von Disulfid-Brücken vermindert (Cleland, 1964). Da in den PFLG-3- und PFLG-4-Abschnitten keine Cysteine vorliegen und im SUMO Fusionstag nur ein Cystein vorliegt, ist die Ausbildung intramolekularer Disulfid-Brücken zwar nicht möglich, dennoch besteht die Möglichkeit, dass sich zwischen zwei Fusionstags intermolekulare Disulfid-Brücken ausbilden. Dies hätte zur Folge, dass sich die Tertiärstruktur dieser Abschnitte wahrscheinlich so verändert, dass es für die eingesetzte SUMO Protease 2 nicht mehr möglich ist, die für die Hydrolyse notwendige Tertiärstruktur der Fusionstags zu erkennen. Das DTT erfüllt die oben beschriebene Funktion nur in seiner reduzierten Form, als oxidierte Form ist DTT diesbezüglich inaktiv. Da DTT in seiner reduzierten Form nicht für einen längeren Zeitraum stabil vorliegt (Burmeister Getz et al., 1999), sondern in die energetisch günstigere oxidierte Form übergeht und die Zufuhr von Licht und damit von Energie den Übergang in die oxidierte Form beschleunigt, ist es demnach sinnvoll, den Reaktionsansatz der Proteolyse vor Licht zu schützen. Um zu verhindern, dass das DTT nach einem gewissen Zeitraum vollständig in der oxidierten Form vorliegt, könnte es sinnvoll sein, in weiteren Versuchen jeweils kleinere DTT-Mengen portioniert über den gesamten Verlauf der Inkubation zuzuführen.

Während des Aufreinigungsprozesses ist es zudem von Bedeutung, die Proteinfractionen im Anschluss an die C8-Umkehrphasen-HPLC und die C4-Umkehrphasen-HPLC nicht in Kunststoffröhrchen aufzufangen und zu lagern. Bei Bestimmungen der Protein-Mengen mittels C2/C18-Umkehrphasen-HPLC zeigten sich hier deutlich geringere Mengen als nach der Größe der Peaks der C8- bzw. C4-Umkehrphasen-HPLC zu erwarten gewesen wäre. Die ermittelten Mengen für PFLG-3 und PFLG-4 waren zudem bei weitem geringer als die zwischenzeitlich für deren jeweilige Fusionsproteine bestimmten Mengen. Nach einer Bestimmung der Mengen von PFLG-4 in verschiedenen Proben wurden diese zu einer

einigen Probe zusammengefügt. Die anschließend ermittelte Menge lag bei weitem unter dem Wert, der sich aus der Addition der Einzelwerte ergeben hätte. Durch das Ersetzen der Kunststoff- durch Glasröhrchen konnten diese Verluste sehr deutlich reduziert werden. Eine mögliche Erklärung könnten Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche der Kunststoffröhrchen und den exprimierten Proteinen sein, die dazu führen, dass die Proteine aufgrund von Adhärenz in den Röhrchen verbleiben. Zwar ist es prinzipiell denkbar, durch die Zugabe von Rinderalbumin (BSA) bzw. die Nutzung BSA-beschichteter Röhrchen unspezifische Bindungsstellen an der Kunststoff-Oberfläche zu blockieren (Suelter und DeLuca, 1983), dennoch könnte dies möglicherweise im weiteren Verlauf der Aufreinigung zu Problemen führen. So würden bei der Zugabe von BSA Anteile in Lösung verbleiben und auch bei BSA-beschichteten Röhrchen könnten möglicherweise Anteile des BSA wieder in Lösung gehen. Dies würde eine exakte Bestimmung der Proteinmenge für PFLG-3 und PFLG-4 unmöglich machen, da auch das bovine Serumalbumin zur Lichtextinktion beiträgt. Weiterhin könnte im Rahmen der antimikrobiellen Tests nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass eine eventuell nachgewiesene antimikrobielle Aktivität durch Wechselwirkungen zwischen BSA und dem zu testenden Protein zustande kommt. Der Einsatz von Glasröhrchen scheint daher für die Aufreinigung von PFLG-3 und PFLG-4 eine sinnvolle Alternative zum Auffangen und Lagern der mittels HPLC getrennten Fraktionen.

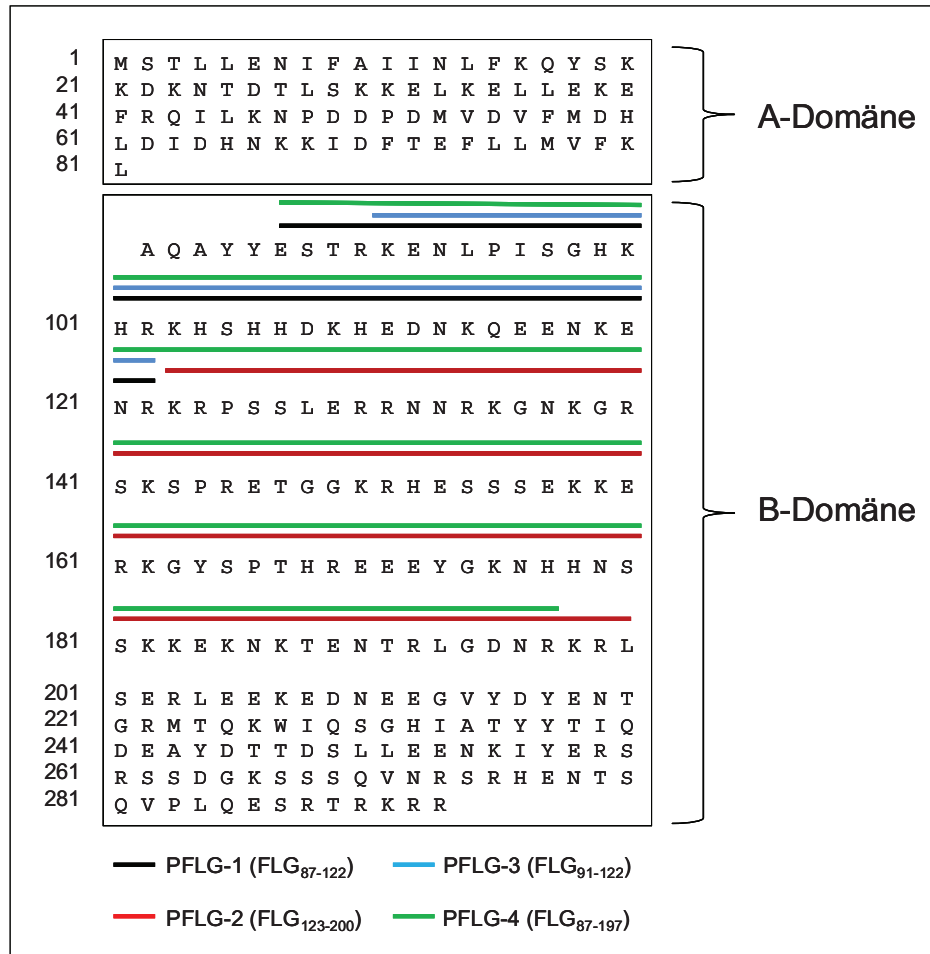
## 4.2. Antimikrobielle Eigenschaften von PFLG-3 und PFLG-4

Das Profilaggrin-Fragment PFLG-4 zeigte bei vergleichsweise hohen Konzentrationen antimikrobielle Aktivität gegen das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus*, die Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie die Hefe *Candida albicans* in radialen Plattendiffusionstests (Tab. 3.2.). PFLG-3 dagegen wies keine Aktivität gegen die genannten Erreger auf.

Sowohl PFLG-3 als auch PFLG-4 sind Fragmente aus dem N-terminalen Bereich von Profilaggrin. Dieser besteht aus einer 81 Aminosäuren großen Domäne A und einer Domäne B, welche die 212 darauffolgenden Aminosäuren bis zur ersten trunkierten Filaggrin-Untereinheit beinhaltet (Presland et al., 1992; Presland et al., 1997). Im Verlauf der posttranslationalen Prozessierung kommt es zur Abspaltung des N-terminalen Bereiches vom übrigen Profilaggrin-Molekül durch die Proprotein-Convertasen Furin und PACE 4 (Barr, 1991). Da Fragmente nachgewiesen wurden, die nur mit einem Antikörper gegen die Domäne A reagierten, ist davon auszugehen, dass in einem weiteren Prozessierungsschritt die Domäne A und die Domäne B voneinander getrennt werden (Presland et al., 1997). Die in dieser Arbeit untersuchten Fragmente PFLG-3 und PFLG-4 sind beide in der Domäne B

lokalisiert, wobei PFLG-3 die Aminosäuren 10 bis 41 der Domäne B (bezogen auf das gesamte Profilaggrin-Molekül Aminosäure 91-122) beinhaltet. PFLG-4 schließt PFLG-3 ein und entspricht den Aminosäuren 6 bis 116 der Domäne B (bezogen auf das gesamte Profilaggrin-Molekül Aminosäure 87 bis 197; siehe Abb. 4.1.). Die Domäne B des Profilaggrins trägt eine Signalsequenz, die bei der Translokation der N-terminalen Domäne in den Zellkern von Bedeutung ist und damit bei der Regulation der Umwandlung der vitalen Keratinozyten des Stratum granulosum in die avitalen Korneozyten des Stratum corneum von Bedeutung ist (Ishida-Yamamoto et al., 1998; Pearton et al., 2002; Zhang et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass sich in dieser Domäne B Abschnitte finden, die antimikrobielle Eigenschaften aufweisen.

Da in unserer Arbeitsgruppe weitere Fragmente der Domäne B auf antimikrobielle Aktivität getestet wurden, lassen sich weitere Aussagen über die Lokalisation der antimikrobiell wirksamen Abschnitte treffen. So wurden von Christian Schulz die Profilaggrin-Fragmente PFLG-1 und PFLG-2 näher untersucht: PFLG-1 reicht im Profilaggrin-Molekül von Aminosäure 87 bis 122, PFLG-2 schließt sich hier direkt an und reicht von Aminosäure 123 bis 200. Vergleicht man diese Sequenzen mit dem in dieser Arbeit getesteten PFLG-4, zeigt sich, dass dies ein um die letzten drei Aminosäuren verkürztes „Fusionsprotein“ von PFLG-1 und PFLG-2 darstellt (siehe Abb. 4.1.).



**Abb. 4.1: Aminosäuresequenz aus dem N-Terminus von Profilaggrin.** Der 293 Aminosäuren große N-Terminus von Profilaggrin gliedert sich in eine 87 Aminosäuren große A- und eine 212 Aminosäuren große B-Domäne. Farblich markiert sind die Sequenzen der im Rahmen dieser Dissertation exprimierten Profilaggrin-Teilproteine PFLG-3 und PFLG-4, sowie die Sequenzen von PFLG-1 und PFLG-2, die in einer weiteren Dissertation exprimiert wurden und in die Diskussion dieser Arbeit einbezogen werden.

Vergleicht man nun weiter die antimikrobiellen Eigenschaften dieser Fragmente, so fällt auf, dass die antimikrobielle Aktivität für PFLG-2 und PFLG-4 gegen den Gram-positiven Erreger *Staphylococcus aureus*, den Gram-negativen Keim *Escherichia coli* und die Hefe *Candida albicans* nahezu identisch ist (Schulz, 2010). Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität gegen die genannten Erreger hauptsächlich in dem durch PFLG-2 repräsentierten Abschnitt lokalisiert ist. Diese Aussage wird zudem dadurch unterstützt, dass für PFLG-1 gegen keinen dieser Keime antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden konnte. Weiterhin besitzen die letzten drei Aminosäuren von PFLG-2 offensichtlich keinen bedeutenden Einfluss auf antimikrobielle Eigenschaften. Ein bedeutsamer Unterschied zwischen PFLG-2 und PFLG-4 zeigte sich bezüglich der antimikrobiellen Potenz gegenüber dem Gram-

negativen Keim *Pseudomonas aeruginosa*, da sich für PFLG-4 im Gegensatz zu PFLG-2 eine Aktivität nachweisen ließ. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass sich für PFLG-1 ebenfalls keine Aktivität gegen dieses Bakterium nachweisen ließ (Schulz, 2010), so dass die Aktivität gegen dieses Bakterium offensichtlich erst aus dem Zusammenwirken physikalischer oder chemischer Eigenschaften der Fragmente PFLG-1 und PFLG-2 entsteht. Eine mögliche Erklärung wäre eine veränderte Tertiärstruktur dieser beiden Einzelfragmente im Rahmen des „Fusionsproteins“ PFLG-4, welche die angesprochene Wirksamkeit erst ermöglicht. Da es sich bei vielen antimikrobiell wirksamen Peptiden um kationische Polypeptide handelt (Hancock und Diamond, 2000), bestand eine Überlegung darin, dass PFLG-4 möglicherweise stärker kationisch als PFLG-2 ist und durch das Überschreiten einer Art „kritischen Grenzwertes“ die Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* zu erklären wäre. Bei dem Vergleich der pI-Werte dieser zweier Fragmente zeigte sich jedoch, dass PFLG-2 mit einem pI-Wert von 10,71 sogar noch kationischer ist als PFLG-4 mit einem pI-Wert von 10,19, so dass die Ladung nicht als mögliche Erklärung für die unterschiedliche Aktivität gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* herangezogen werden kann.

Wie bereits erwähnt, konnte für PFLG-3 gegen keinen der getesteten Mikroorganismen antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden. Bei PFLG-3 handelt es sich um ein um die ersten vier Aminosäuren verkürztes Fragment des von Christian Schulz untersuchten PFLG-1. Da sich auch in diesem Fragment keine antimikrobielle Aktivität nachweisen ließen (Schulz, 2010), liegen vermutlich in diesem Abschnitt der Profilaggrin-B-Domäne keine antimikrobiell wirksamen Sequenzen vor. Dennoch bleibt zu berücksichtigen, dass die fehlende Aktivität auf Eigenschaften des Testsystems zurückzuführen sein könnte. So wäre es beispielsweise denkbar, dass PFLG-3 aufgrund seiner Ladung und seiner Größe im radialen Plattendiffusionstest nicht den eigentlichen Ort seiner Wirksamkeit - und damit die zu testenden Bakterien – erreicht. Da PFLG-3 jedoch ein kleineres Molekül als PFLG-4 ist und daher prinzipiell besser diffundieren sollte als PFLG-4, ist dies als eher unwahrscheinlich einzustufen. Die Durchführung weiterer antimikrobieller Tests wie z. B. Mikrodilutionstests könnte weitere Einblicke in Bezug auf mögliche antimikrobielle Aktivität geben, da in diesem Testsystem die Diffusionseigenschaften der getesteten Fragmente nicht von Bedeutung wären.

### 4.3. Mögliche Wirkmechanismen von PFLG-4

Nachdem für PFLG-4 antimikrobielle Aktivität nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage nach möglichen Wirkmechanismen. Bei einem Großteil der bisher bekannten antimikrobiellen Peptide handelt es sich überwiegend um kleine, vorwiegend kationische

Peptide mit einer Größe von 3-5 kDa (Hancock und Diamond, 2000). Mit einem pI-Wert von 10,19 handelt es sich auch bei PFLG-4 um ein stark kationisches Peptid. Das nicht antimikrobiell aktive PFLG-3 weist mit einem pI-Wert von 8,39 eine deutlich geringere positive Ladung auf. Da sowohl Gram-negative Bakterien durch Lipopolysaccharid-Moleküle als auch Gram-positive Bakterien durch Teichonsäuren auf ihrer Oberfläche negativ geladen sind, ist die initiale Bindung der positiv geladenen antimikrobiellen Peptide erleichtert (Hale und Hancock, 2007). Da antimikrobielle Peptide zudem hydrophobe Anteile aufweisen, sind sie in der Lage, in Membranen von Mikroorganismen einzudringen und durch Oligomerisierung Poren zu bilden (Lehrer, 2004). Ähnliche Wirkmechanismen sind auch für PFLG-4 vorstellbar. Als weiterer generell möglicher Wirkungsort von antimikrobiellen Peptiden und somit auch von PFLG-4 ist die Zellwand zu nennen. So konnte gezeigt werden, dass *Staphylococcus aureus*-Stämme nach Inkubation mit dem in die Zellwandsynthese eingreifenden Antibiotikum Penicillin eine ähnliche Morphologie aufwiesen wie nach Inkubation mit dem antimikrobiellen Peptid humanes Beta-Defensin 3 (Giesbrecht et al., 1998; Harder et al., 2001). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die eigentliche antimikrobielle Aktivität erst aus der Beeinflussung intrazellulärer Strukturen resultiert. So könnte es hier zur Interaktion mit zahlreichen negativ geladenen Strukturen kommen, unter anderem auch mit RNA oder DNA (Hale und Hancock, 2007). Zwar ist der prinzipielle Aufbau der RNA und DNA bei Prokaryoten und Eukaryoten ähnlich, dennoch sind sowohl RNA als auch DNA zum Teil unterschiedlich modifiziert und mit Proteinen assoziiert (Vellai und Vida, 1999). Diese Modifikationen könnten ein Grund dafür sein, dass körpereigene Zellen vor der zytotoxischen Wirkung der antimikrobiellen Peptide weitestgehend geschützt sind. Eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass sich die antimikrobiellen Peptide gegen Mikroorganismen, nicht aber gegen körpereigene Zellen richten, könnte wiederum in speziellen Strukturen der Zellmembran bzw. Zellwand von Mikroorganismen zu finden sein, die das Eindringen der antimikrobiellen Peptide ins Innere der Zellen überhaupt erst ermöglichen. So konnte gezeigt werden, dass der hohe Cholesterin-Anteil in den Zellmembranen von Säugetieren eine Verminderung der antimikrobiellen Aktivität bewirkt, indem Cholesterin für eine Stabilisierung der Zellmembran sorgt und durch direkte Interaktion zu einer Neutralisierung der antimikrobiellen Peptide führt (Matzusaki, 1999). Weiterhin beruht die Selektivität dieser Peptide gegen Bakterien auf dem höheren Membranpotential sowie dem höheren Anteil anionischer Strukturen der Prokaryoten gegenüber Eukaryoten (Hancock, 1999). Um genauere Erkenntnisse über die Wirkmechanismen von PFLG-4 zu erlangen, sollten sich hier weitere Studien anschließen. So könnte der Nachweis einer Zelllyse mittels Sytox® Green Assay erfolgen, bei dem Nukleinsäuren mit hoher Affinität gefärbt werden. Dieser Farbstoff kann löchrige Zellmembranen durchdringen, bei intakten Zellmembranen ist dies nicht möglich (Wottrich,

2003). Nach Inkubation von Mikroorganismen mit PFLG-4 wäre es zudem möglich, mittels elektronenmikroskopischer Analyse der Zellmembran Erkenntnisse bezüglich des Wirkmechanismus zu gewinnen.

Neben der antimikrobiellen Aktivität gegen Bakterien konnte für PFLG-4 auch Aktivität gegen *Candida albicans* nachgewiesen werden. Über die wesentlichen Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide gegen Pilze gibt es bisher kaum Erkenntnisse (Zaiou, 2007). Analog den Mechanismen bei Bakterien werden Modelle zur Zerstörung der Zellmembran sowie der Interaktion mit spezifischen intrazellulären Strukturen vorgeschlagen (Zaiou, 2007). Ähnliche Mechanismen sind auch für PFLG-4 denkbar. In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, ob PFLG-4 auch gegen weitere Pilze wie beispielsweise Dermatophyten wirksam ist.

#### 4.4. Einsatz von PFLG-4 als Therapeutikum

Aufgrund der nachgewiesenen antimikrobiellen Aktivität von PFLG-4 besteht prinzipiell die Möglichkeit, dieses Fragment zur Therapie verschiedener Infektionserkrankungen einzusetzen. So könnten antimikrobielle Peptide eine effektive Alternative zu bisher verwendeten Antibiotika sein (Hancock und Chapple, 1999). Insbesondere der unkritische Einsatz von Antibiotika in den letzten Jahrzehnten hat zu einer deutlichen Zunahme von Resistenzen geführt, die es einer Vielzahl von Mikroorganismen ermöglicht, sich der ursprünglich vorhandenen abtötenden oder im Wachstum hemmenden Wirkung von Antibiotika zu entziehen (Horn et al., 2002). Diese Antibiotikaresistenzen stellen für die behandelnden Ärzte ein zunehmendes Problem dar. So haben sich beispielsweise in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten für die früher wirksamen Penicilline bei den Erregern der Gonorrhoe, *Neisseria gonorrhoeae*, zunehmend Resistenzen entwickelt (Klischies, 2004). Sollte sich diese Entwicklung weiter fortsetzen, wird es in Zukunft schwieriger werden, bakterielle Infektionen zu behandeln. Aus diesen Gründen sollte ein Fokus auf die Entwicklung alternativer Antibiotika gerichtet sein. Mit antimikrobiellen Peptiden scheinen Substanzen vorzuliegen, die durch ihre Eigenschaften konventionelle Antibiotika zunehmend ergänzen bzw. ersetzen könnten (Giuliani et al., 2007). Für diese Peptide gilt, dass bei ihrem Einsatz eine deutlich geringere Anzahl von induzierten Resistenzen auftreten (Yeaman und Yount, 2003). Bei vielen antimikrobiellen Peptiden handelt es sich um als phylogenetisch alt angesehene Moleküle (Meyer et al., 2000), die in der Lage sind, hochkonservierte Strukturen der Mikroorganismen zu erkennen, so dass viele Mikroorganismen noch immer keine Resistenzen entwickeln konnten. Dies lässt sich u. a. damit begründen, dass viele der antimikrobiellen Peptide offensichtlich verschiedene Wirkungsorte innerhalb einer Zelle



haben und damit eine Resistenz-Entwicklung erschweren (Powers und Hancock, 2004). Zudem greifen die antimikrobiellen Peptide an Strukturen an, die so hochkonserviert sind, dass die Mikroorganismen nicht in der Lage sind, diese so effektiv zu modulieren, dass sie ausreichend resistent gegen antimikrobielle Peptide sind (Giesbrecht et al., 1998; Hale und Hancock, 2007). Hinsichtlich einer dennoch möglichen Resistenz-Entwicklung wäre es sinnvoll zu testen, ob nach einer Vielzahl von Inkubations-Passagen mit subletalen Dosen von PFLG-4 Erreger nachzuweisen sind, die eine Resistenz gegen dieses antimikrobielle Peptid entwickelt haben. So konnten beispielsweise bei *Escherichia coli*-Bakterien Resistenzen nachgewiesen werden, nachdem 600-700 Generationen mit dem Magainin-Analogon Paxiganan in subletalen Dosen inkubiert wurden (Perron et al., 2005).

Weiterhin bieten viele antimikrobielle Peptide den Vorteil, dass sie Aktivität gegen viele verschiedene Mikroorganismen aufweisen (Hancock und Sahl, 2006). Für einige antimikrobiellen Peptide konnte zudem nachgewiesen werden, dass sie neben Bakterien auch gegen Viren, Pilze und sogar entartete Tumorzellen wirksam sind (Baker et al., 1993; Soballe et al., 1995; Lehmann et al., 2006; Oyston et al., 2009). Die Ergebnisse der radialen Plattendiffusionstests für PFLG-4 zeigten Aktivität gegen *S. aureus*, einem Vertreter der Gram-positive Bakterien, die Gram-negativen Bakterien *E. coli* und *P. aeruginosa* als auch die Hefe *Candida albicans*. Somit scheint dieses Fragment offensichtlich ein breites Wirkungsspektrum gegen verschiedene Mikroorganismen zu besitzen, eine Eigenschaft, die im Falle eines therapeutischen Einsatzes bei Entzündungen, insbesondere bei noch nicht erfolgtem Erregernachweis, von Vorteil wäre. Antimikrobielle Tests gegen weitere Mikroorganismen könnten hier eine genauere Aussage bezüglich des Wirkungsspektrums von PFLG-4 ermöglichen. Da es mittels der in dieser Arbeit erhobenen Daten lediglich möglich war, einen einzigen MEK-Wert für den Einsatz bei *Escherichia coli* zu berechnen, könnten in weiteren antimikrobiellen Tests Zwischenverdünnungen eingesetzt werden: Bei 1:1-Verdünnungen (1µg/µl) zeigte sich gegen alle getesteten Keime Aktivität, bei 1:3-Verdünnungen (0,33µg/µl) zeigte sich in den meisten Fällen keine Aktivität (siehe Tab. 3.2.), so dass in weiteren Tests beispielsweise auch Verdünnungen von 1:1,5 oder 1:2 getestet werden sollten, was bei nachgewiesener Aktivität eine Berechnung der MEK ermöglichen würde und damit eine genauere Aussage über die antimikrobielle Potenz von PFLG-4 zuließe.

Da PFLG-4 ein vom menschlichen Körper synthetisiertes Fragment darstellt, wären bei einem therapeutischen Einsatz antimikrobieller Peptide prinzipiell deutlich weniger Nebenwirkungen zu erwarten als bei körperfremden Antibiotika (Pazdzierny (junior Rubin), 2003). So könnten auch Nebenwirkungen wie periphere Neuropathien bei der Einnahme von Gyrase-Hemmstoffen (z.B. Ciprofloxacin) oder Photosensibilisierung bei der Einnahme von



Tetrazyklinen (Lüllmann, 2003) durch den Einsatz antimikrobieller Peptide vermieden oder reduziert werden.

Dennoch wären im Falle eines therapeutischen Einsatzes von antimikrobiellen Peptiden auch mögliche Nachteile zu bedenken: So ist die Herstellung in ausreichenden Mengen relativ teuer (Marr et al., 2006). In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, die rekombinante Expression von PFLG-4 weiter zu optimieren. Hier besteht beispielsweise die Möglichkeit, die Expression in anderen Zelllinien vorzunehmen. So bieten Hefezellen den Vorteil, dass Proteine direkt in den Kulturüberstand sezerniert werden, was zudem eine Spaltung mittels Protease überflüssig machen würde. Weiterhin tritt die Problematik der möglicherweise falschen Proteinfaltung, die bei der Expression mittels Bakterien auftreten kann, hier nicht auf (Steinborn et al., 2006). Weiterhin weisen die meisten antimikrobiellen Peptide eine kurze Halbwertszeit auf (Zaiou, 2007), die insbesondere bei der intravenösen Verabreichung dazu führen würde, dass nur geringste Anteile der applizierten Menge tatsächlich den Wirkungsort erreichen. Daher sollte versucht werden, eine Applikationsform zu finden, welche die antimikrobiellen Peptide vor ihrem vorzeitigen enzymatischen Abbau schützt. Denkbar wäre auch, PFLG-4 chemisch so zu verändern, dass es stabiler gegenüber seinen spaltenden Enzymen wird. Gleichzeitig müsste allerdings die antimikrobielle Wirkung erhalten bleiben. In diesem Zusammenhang wird beispielsweise am Institut für Biophysik und Röntgenstrukturforschung der Österreichischen Akademie in Graz unter der Leitung von Herrn Dr. Karl Lohner versucht, antimikrobielle Peptide in Liposomen einzuschließen, die neben dem Schutz vor vorzeitigem Abbau gleichzeitig den Vorteil bieten, sich in entzündetem Gewebe anzusammeln (Quelle: [http://www.ibn.oeaw.ac.at/shop/data/container/Media\\_Releases/AntimikrobielleLipidmesophasen.pdf](http://www.ibn.oeaw.ac.at/shop/data/container/Media_Releases/AntimikrobielleLipidmesophasen.pdf)). Das breite Wirkspektrum vieler antimikrobieller Peptide kann ein bedeutsamer Vorteil bei noch nicht erfolgtem Erregernachweis sein. Gleichzeitig besteht diesbezüglich allerdings die Gefahr einer starken Interferenz mit den Bakterien der Normalflora (Zaiou, 2007). So wären beispielsweise Nebenwirkungen ähnlich der Pseudomembranösen Kolitis denkbar, bei der es durch den Einsatz von Antibiotika zu einer Störung des Gleichgewichtes der Darmflora und einer folgenden Überwucherung mit *Clostridium difficile* kommt (Renz-Polster und Krautzig, 2008). Trotz der Tatsache, dass es sich bei PFLG-4 um eine körpereigene Substanz handelt, sind weitere Nebenwirkungen nicht auszuschließen. Dies gilt insbesondere dann, wenn PFLG-4 in Bereichen des Körpers eingesetzt würde, in denen es natürlicherweise nicht vorliegt. So wäre im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz von PFLG-4 die Frage zu klären, ob dieses antimikrobielle Protein Zytotoxizität gegenüber eukaryotischen Zellen aufweist. Dafür könnten beispielsweise Erythrozyten für mehrere Stunden mit PFLG-4 inkubiert werden und anschließend auf Hämolyse untersucht werden. So konnte beispielsweise für LL-37

nachgewiesen werden, dass es in antimikrobiell wirksamen Konzentrationen zur Hämolyse führt (Oren et al., 1999).

Aufgrund der bedeutenden Vorteile antimikrobieller Peptide erscheint es sinnvoll, die genannten Nachteile im Rahmen weiterer Forschungsprojekte zu minimieren. Dass der Einsatz antimikrobieller Peptide als Therapeutikum durchaus denkbar ist, zeigen klinische Studien der Phasen I und II für antimikrobielle Peptide wie Plectasin oder Mersacidin (Giuliani et al., 2007). Prinzipiell denkbar ist der Einsatz in Form von Cremes, Sprays oder die intravenöse Gabe. Auch über den Einsatz von einer mit antimikrobiellen Peptiden beschichteten künstlichen Haut bei Brandverletzten wird nachgedacht (Steinstraesser et al., 2001). Im Rahmen eines therapeutischen Einsatzes wäre es zudem sinnvoll, die Gewebegängigkeit von PFLG-4 zu testen. Dies ließe weitere Rückschlüsse auf mögliche Verabreichungsformen zu.

Neben den bereits angesprochenen Punkten wäre es insbesondere von Bedeutung, die antimikrobielle Aktivität unter physiologischen Bedingungen zu testen. Zudem sollte untersucht werden, ob der menschliche Körper überhaupt in der Lage ist, die Fragmente PFLG-3 und PFLG-4 zu generieren. Weiterhin könnte man bei Tests bezüglich der antimikrobiellen Aktivität Salzkonzentration sowie pH-Wert variieren. Da Salzkonzentration und pH-Wert in verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedlich sind, könnten mit Hilfe dieser Tests weitere Aussagen darüber getätigt werden, wie wirksam die Profilaggrin-Fragmente in den jeweiligen Bereichen wären. Veränderte Salzkonzentrationen ließen zudem eine wichtige Aussage darüber zu, ob ein Einsatz von PFLG-4 im Rahmen von *Pseudomonas*-Infektionen bei Mukoviszidose-Patienten, bei denen sich im Bronchialsekret gegenüber Gesunden deutlich erhöhte Salzkonzentrationen finden (Goldman et al., 1997), sinnvoll wäre. Infolge des oft schweren Verlaufes wäre es hier besonders wünschenswert, eine wirksame Alternative zu den bisherigen, zum Teil unzureichenden Behandlungsmethoden zu finden: Gegen die eingesetzten Antibiotika liegen eine Vielzahl von Resistenzen vor; zudem besitzen Pseudomonaden für viele angewendeten Medikamente wirkungsvolle Efflux-Mechanismen (Zhang et al., 2005).

#### **4.5. Bedeutung von PFLG-3 und PFLG-4 im Rahmen von Erkrankungen**

Für einige chronische Hauterkrankungen wird ein Zusammenhang mit Mutationen im Bereich des Epidermalen Differenzierungskomplexes (siehe 1.4.) diskutiert – so z.B. bei Neurodermitis, Psoriasis und Ichthyosis vulgaris (Übersicht in Hoffjan und Stemmler, 2007).

Bei diesen Erkrankungen findet sich eine Störung im Rahmen des Prozesses der terminalen Differenzierung (siehe 1.4.), die zu einer Einschränkung der Barrierefunktion der Haut führt. In der Folge ist die Haut oft trocken und schuppig, bei Neurodermitis-Patienten auch entzündet. Für einige Mutationen im *Filaggrin*-Gen, das im Bereich des Epidermalen Differenzierungskomplexes in der Region 1q21.3 lokalisiert ist und für Profilaggrin codiert, konnte eine Assoziation mit Atopischer Dermatitis und der autosomal dominant vererbten Form der Ichthyosis vulgaris nachgewiesen werden (Nirunsuksiri et al., 1995; Seguchi et al., 1996; Gruber et al., 2007; Stemmler et al., 2007). Diese Beobachtungen liefern eine mögliche Erklärung für das gehäuft gemeinsame Auftreten von Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris. Die bekannten Mutationen führen zu einem funktionslosen oder in der Funktion eingeschränkten Profilaggrin-Protein (Übersicht in Sandilands et al., 2007). In Folge verschiedener Mutationen ist die Prozessierung des als Proprotein synthetisierten Profilaggrin-Moleküls in seine aktiven Filaggrin-Untereinheiten gestört. Dieser Vorgang ist während der terminalen Differenzierung von entscheidender Bedeutung für die Formation des *Stratum corneum*s und einer intakten (Haut)Barriere (Dale et al., 1997; Candi et al., 1997). Die bisher in diesem Zusammenhang identifizierten Mutationen sind ausschließlich in den Abschnitten lokalisiert, die für die Filaggrin-Untereinheiten codieren (Sandilands et al., 2007). Prinzipiell ist es jedoch nicht auszuschließen, dass auch Mutationen im Bereich des N-Terminus von Profilaggrin, also den Bereichen die für die PFLG-Fragmente PFLG-3 und PFLG-4 kodieren, eine Assoziation mit den genannten Erkrankungen aufweisen könnten. Für einen komplett innerhalb von PFLG-4 liegenden Abschnitt der B-Domäne (Aminosäuren 122 bis 138 der B-Domäne) aus dem N-Terminus konnte gezeigt werden, dass dieser in den Zellkern transloziert wird und dort am Prozess der terminalen Differenzierung beteiligt ist (Ishida-Yamamoto et al., 1998; Pearton et al., 2002; Zhang et al., 2002). Demnach könnten Mutationen in diesem Bereich ähnliche Auswirkungen haben wie diejenigen Mutationen, für die eine Assoziation mit Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris nachgewiesen wurde. Möglicherweise spielen Mutationen im N-terminalen Bereich des Filaggrin-Gens auch eine Rolle in der Pathogenese anderer Erkrankungen. Da im Rahmen dieser Arbeit antimikrobielle Aktivität für PFLG-4 nachgewiesen wurde, könnte diese Fragestellung insbesondere für Erkrankungen im Bereich der Haut interessant sein, bei denen gehäuft Infektionen auftreten. Durch die Untersuchung des N-Terminus des *Filaggrin*-Gens auf signifikant gehäufte Mutationen ließen sich also möglicherweise neue Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese verschiedener Hauterkrankungen gewinnen.

Neben der angesprochenen trockenen und schuppigen Haut finden sich bei Patienten mit Atopischer Dermatitis und Ichthyosis vulgaris zudem gehäuft Hautinfektionen, insbesondere mit *Staphylococcus aureus* (Baker, 2006). Diese Beobachtungen wurden bisher vor allem darauf zurückgeführt, dass bei beiden Erkrankungen die Barrierefunktion gestört und damit

ein bedeutsamer Faktor der Abwehrmechanismen der Haut in seiner Wirkung vermindert ist (Proksch et al., 2006). Infolge des oft ausgeprägten Juckreizes bei Patienten mit Atopischer Dermatitis ist zudem eine Inokulation von Erregern durch häufiges Kratzen denkbar. Nachdem in dieser Arbeit antimikrobielle Aktivität für PFLG-4 nachgewiesen wurde, könnten Mutationen, die zu einer herabgesetzten Funktion dieses Fragmentes führen, eine ergänzende Erklärung für die Häufung der Infektionen liefern. Wie oben beschrieben, konnten Mutationen im *Filaggrin*-Gen nachgewiesen werden, welche die Prozessierung von Profilaggrin verhindern bzw. einschränken (Sandilands et al., 2007). Dies könnte dazu führen, dass auch die N-terminale Domäne nicht mehr korrekt prozessiert wird, was wiederum dazu führen könnte, dass PFLG-4 nicht korrekt freigesetzt wird. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen ist, dass das Profilaggrin-Fragment PFLG-4 physiologisch freigesetzt wird. In der Folge könnte eine gesteigerte Anfälligkeit für Infektionen resultieren. Ein Vergleich der Verteilungsmuster von PFLG-4 und weiteren N-terminalen Fragmenten des Profilaggrins in Haut gesunder Menschen mit Haut von Atopischen Dermatitis- und Ichthyosis vulgaris-Patienten könnte weiterführende Ergebnisse liefern. Dazu könnten Antikörper eingesetzt werden, die gegen verschiedene N-terminale Profilaggrin-Fragmente gerichtet sind.

Um weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von PFLG-4 im Rahmen der Pathogenese von Erkrankungen zu gewinnen, wäre es denkbar, Mausmodelle einzusetzen. Das PFLG-4-Fragment stellt einen Abschnitt der B-Domäne aus dem N-terminalen Bereich von Profilaggrin dar. Beim Vergleich der humanen mit der murinen Aminosäuresequenz zeigten sich diese Abschnitte nur wenig konserviert. Aus diesem Grund wäre es zunächst sinnvoll zu testen, ob die entsprechenden Abschnitte der Maus überhaupt eine vergleichbare Funktion aufweisen wie PFLG-4. Dazu wäre es möglich, die entsprechenden Abschnitte der Maus ähnlich wie PFLG-4 in dieser Arbeit rekombinant zu exprimieren. Wären in anschließenden Tests antimikrobielle Eigenschaften nachzuweisen, könnte man von einem funktionellen Ortholog auszugehen, so dass der Einsatz von „knock-out“-Mäusen, bei denen der entsprechende Abschnitt ausgeschaltet würde, sinnvoll wäre. Im Falle eines gehäuftten Auftretens von Hautinfektionen bei den „knock-out“-Mäusen wären Aussagen über die Bedeutung von PFLG-4 im Rahmen der Infektabwehr möglich. Diesbezüglich bleibt zu berücksichtigen, dass Expression und Funktion der anderen Abschnitte von Profilaggrin unbeeinträchtigt sein müssten, um fundierte Aussagen über den Abschnitt von PFLG-4 treffen zu können.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurden erste Einblicke über die Funktion der Profilaggrin-Fragmente PFLG-3 und PFLG-4 gewonnen. Um weitere Erkenntnisse über ihre

Funktion und ihre Bedeutung im Rahmen des Schutzes vor Infektionen sowie bezüglich eines möglichen therapeutischen Einsatzes zu gewinnen, sind weitere Analysen notwendig.

## 5. Zusammenfassung

Die menschliche Haut ist als große Kontaktfläche zur Umwelt ständig einer Vielzahl von Bakterien, Viren und Pilzen und damit potentiellen Krankheitserregern ausgesetzt. Dennoch treten bei gesunden Menschen nur selten Hautinfektionen auf. An dieser natürlichen Resistenz ist neben einer physikalischen Barriere auch eine „chemische Barriere“ beteiligt. Zusätzlich zu ihrem „Säureschutzmantel“ (pH ca. 5,0) verfügt die Haut mit der Produktion von antimikrobiellen Peptiden über wirkungsvolle Abwehrmechanismen gegen das Eindringen von Mikroorganismen.

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten in antimikrobiell aktiven HPLC-Fractionen von Proteinextrakten des *Stratum corneums* gesunder Menschen unter anderem N-terminal lokalisierte Fragmente von Profilaggrin nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es nun, die Rolle der Fragmente FLG<sub>91-122</sub> (PFLG-3) und FLG<sub>87-197</sub> (PFLG-4) im Rahmen der kutanen Abwehr zu klären. Dazu wurden diese Fragmente als nicht-toxisches Fusionsprotein rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert, vom Fusionsabschnitt abgespalten, aufgereinigt und auf antimikrobielle Eigenschaften getestet.

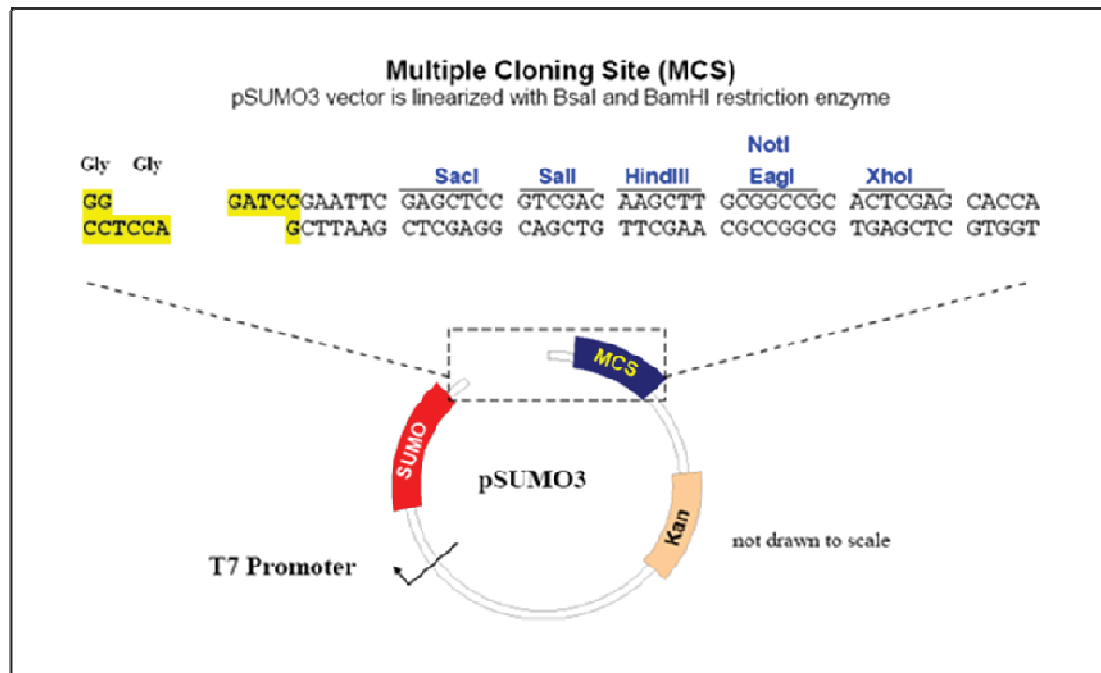
Für PFLG-4 konnte im radialen Plattendiffusionstest antimikrobielle Aktivität gegen das Gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus*, für die Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie die Hefe *Candida albicans* nachgewiesen werden. PFLG-3 zeigte gegen die genannten Mikroorganismen keine Aktivität.

Neben den bereits bekannten Funktionen des Profilaggrin-Proteins konnte in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass ein definierter in der Haut nachweisbarer N-terminaler Abschnitt von Profilaggrin antimikrobielle Eigenschaften aufweist und somit möglicherweise einen direkten Beitrag zur kutanen Abwehr von Mikroorganismen leistet.

Um genauere Aussagen über die Funktion von PFLG-3 und PFLG-4 und ihre Bedeutung im Rahmen des Schutzes vor Infektionen sowie bezüglich eines möglichen therapeutischen Einsatzes von PFLG-4 treffen zu können, sind weitere Analysen nötig.

## 6. Anhang

### 6.1. Vektorkarte des pSUMO3-Expressionsvektors



**Abb. 6.1: Schematische Darstellung des pSUMO3-Expressionsvektors.** Eingezeichnet sind Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme und als Kästen wichtige Sequenzabschnitte des Vektors. Kan: Gen für Kanamycin-Resistenz; MCS: "Multiple Cloning Site"; SUMO: SUMO-Gensequenz. (Aus: Polylinker map (pSUMO3 vector, T7 Kan), LifeSensors.)

### 6.2. Abkürzungen der Aminosäuren und Nukleinsäuren

**Tab. 6.1.: Abkürzungen der Aminosäuren**

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Iso	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Try	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

**Tab. 6.2: Abkürzung der Nukleinsäuren**

Base	Nukleosid	Abk.
Adenin	Adenosin	A
Guanin	Guanosin	G
Cytosin	Cytidin	C
Thymin	Thymidin	T

### 6.3. Sequenzen

#### 6.3.1. cDNA und Proteinsequenz des humanen Profilaggrin

Die cDNA-Sequenz umfasst 12747 bp, die Protein-Sequenz 4061 Aminosäuren. Sowohl die cDNA- als auch die Protein-Sequenz des humanen Profilaggrins sind über die NCBI-Zugangsnummer NM\_00201 auf der NCBI-Seite unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> verfügbar.

#### 6.3.2 Übersicht der rekombinanten Proteinfragmente von Profilaggrin

##### 6.3.2.1 PFLG-3

Nukleotidsequenz (bp 271-366)

aaagagaatttaccgatatcaggacacaagcacagaaagcacagtcatcatgataaacatgaagataataaacaggaagaa  
aacaagaaaaacaga

Proteinsequenz (Aminosäuren 91-122)

KENLPISGHKHKHSHHDKHEDNKQEENKENR



### 6.3.2.2 PFLG-4

Nukleotidsequenz (bp 259-591)

```
gagtctaccagaaaagagaatttaccgatatcaggacacaagcacagaaagcacagtcacatgataaacatgaagataata  
aacaggaagaaaaacaaagaaaacagaaaaagaccctcaagtctggaaagaagaaacaatagaaaagggaataaggga  
agatccaagagcccaagagaaacaggggggaaaaggcatgaatctagttctgaaaaaaaagaaagaaaaggatattcacc  
tactcatagagaagaagaatatggaaaaaacatcataactcaagtaaaaaagagaaaaacaagactgaaaatactagatta  
ggagacaatagg
```

Proteinsequenz (Aminosäuren 87-197)

```
ESTRKENLPISGHKHKRKHSHHDKHEDNKQEENKENRKRPSSELRNNRKGNKGRSKSPRE  
TGGKRHESSEKKERKGYSPTTHREEEYGKNHHNSSKKEKNKTENTRLGDNR
```

## 7. Literatur

1. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 Suppl 1:11830-5.
2. Baker BS. The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 2006;144(1):1-9.
3. Baker TA. Protein-DNA assemblies controlling lytic development of bacteriophage Mu. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(5):708-12.
4. Barton P, Malcolm S, Murphy C, Ferguson-Smith MA. Localization of the human alpha-globin gene cluster to the short arm of chromosome 16 (16p12-16pter) by hybridization in situ. *J Mol Biol* 1982;156(2):269-78.
5. Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* 2003;254(3):197-215.
6. Braff MH, Bardan A, Nizet V, Gallo RL. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 2005;125(1):9-13.
7. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr Purif* 2005;43(1):1-9.
8. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(4):328-40.
9. Chen VL, France DS, Martinelli GP. De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 1986;87(5):585-7.
10. Cleland WW. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups. *Biochemistry* 1964;3:480-2.
11. Contzler R, Favre B, Huber M, Hohl D. Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 2005;124(5):990-7.

12. Dale BA, Presland RB, Lewis SP, Underwood RA, Fleckman P. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J Invest Dermatol* 1997;108(2):179-87.
13. Dale BA, Scofield JA, Hennings H, Stanley JR, Yuspa SH. Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium. *J Invest Dermatol* 1983;81(1 Suppl):90s-5s.
14. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol* 2008;180(3):451-8.
15. Elias PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 2005;125(2):183-200.
16. Elias PM. Skin barrier function. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008;8(4):299-305.
17. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997;272(24):15258-63.
18. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 1990;29(40):9432-40.
19. Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* 1998;10(1):41-4.
20. Getz EB, Xiao M, Chakrabarty T, Cooke R, Selvin PR. A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem* 1999;273(1):73-80.
21. Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H, Wecke J. Staphylococcal cell wall: morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(4):1371-414.
22. Glaser R, Harder J, Lange H, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection. *Nat Immunol* 2005;6(1):57-64.

23. Gruber R, Janecke AR, Fauth C, Utermann G, Fritsch PO, Schmuth M. Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur J Hum Genet* 2007;15(2):179-84.
24. Hale JD, Hancock RE. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007;5(6):951-9.
25. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(6):1317-23.
26. Hancock RE, Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 2000;8(9):402-10.
27. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006;24(12):1551-7.
28. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387(6636):861.
29. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001;276(8):5707-13.
30. Harder J, Glaser R, Schroder JM. Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity. *J Endotoxin Res* 2007;13(6):317-38.
31. Harder J, Schroder JM. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 2002;277(48):46779-84.
32. Harding CR. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 2004;17 Suppl 1:6-15.
33. Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV, Scott IR. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci* 2000;22(1):21-52.
34. Hoffjan S, Stemmler S. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol* 2007;157(3):441-9.

35. Huber M, Siegenthaler G, Mirancea N, Marenholz I, Nizetic D, Breitkreutz D, et al. Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J Invest Dermatol* 2005;124(5):998-1007.
36. Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin WM, Dale BA, Iizuka H. Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *Br J Dermatol* 1997;137(1):9-16.
37. Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland RB, Dale BA, Iizuka H. Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest* 1998;78(10):1245-53.
38. Kamysz W, Okroj M, Lukasiak J. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol* 2003;50(2):461-9.
39. Kunkel TA. DNA replication fidelity. *J Biol Chem* 1992;267(26):18251-4.
40. Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, Suttman H, Sell M, Paulsen F, et al. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur Urol* 2006;50(1):141-7.
41. Lehrer RI. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(9):727-38.
42. List K, Szabo R, Wertz PW, Segre J, Haudenschield CC, Kim SY, et al. Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J Cell Biol* 2003;163(4):901-10.
43. Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh NH. Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J Biol Chem* 2001;276(50):47445-52.
44. Makino T, Takaishi M, Toyoda M, Morohashi M, Huh NH. Expression of hornerin in stratified squamous epithelium in the mouse: a comparative analysis with profilaggrin. *J Histochem Cytochem* 2003;51(4):485-92.
45. Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics* 2004;5(1-2):75-86.

46. Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, Gan SQ, Idler WW, Steinert PM. Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Mol Cell Biol* 1993;13(1):613-25.
47. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6(5):468-72.
48. McKinley-Grant LJ, Idler WW, Bernstein IA, Parry DA, Cannizzaro L, Croce CM, et al. Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(13):4848-52.
49. Meyer JE, Harder J, Gorogh T, Schroder JM, Maune S. [hBD-2 gene expression in nasal mucosa]. *Laryngorhinootologie* 2000;79(7):400-3.
50. Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 1996;106(5):989-92.
51. K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-73.
52. Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 1999;31(1):5-19.
53. Nirunsuksiri W, Presland RB, Brumbaugh SG, Dale BA, Fleckman P. Decreased profilaggrin expression in ichthyosis vulgaris is a result of selectively impaired posttranscriptional control. *J Biol Chem* 1995;270(2):871-6.
54. Oyston PC, Fox MA, Richards SJ, Clark GC. Novel peptide therapeutics for treatment of infections. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 8):977-87.
55. Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006;38(4):441-6.

56. Pearton DJ, Dale BA, Presland RB. Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J Invest Dermatol* 2002;119(3):661-9.
57. Pearton DJ, Nirunsuksiri W, Rehemtulla A, Lewis SP, Presland RB, Dale BA. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp Dermatol* 2001;10(3):193-203.
58. Presland RB, Bassuk JA, Kimball JR, Dale BA. Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol* 1995;104(2):218-23.
59. Presland RB, Haydock PV, Fleckman P, Nirunsuksiri W, Dale BA. Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem* 1992;267(33):23772-81.
60. Presland RB, Kimball JR, Kautsky MB, Lewis SP, Lo CY, Dale BA. Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 1997;108(2):170-8.
61. Qu XD, Lehrer RI. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun* 1998;66(6):2791-7.
62. Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 1994;103(5):731-41.
63. Resing KA, Thulin C, Whiting K, al-Alawi N, Mostad S. Characterization of profilaggrin endoproteinase 1. A regulated cytoplasmic endoproteinase of epidermis. *J Biol Chem* 1995;270(47):28193-8.
64. Sahly H, Schubert S, Harder J, Rautenberg P, Ullmann U, Schroder J, et al. Burkholderia is highly resistant to human Beta-defensin 3. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(5):1739-41.
65. Sandilands A, Smith FJ, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin's fuller figure: a glimpse into the genetic architecture of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007;127(6):1282-4.

66. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 2009;122(Pt 9):1285-94.
67. Schadow A, Scholz-Pedretti K, Lambeau G, Gelb MH, Furstenberger G, Pfeilschifter J, et al. Characterization of group X phospholipase A(2) as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. *J Invest Dermatol* 2001;116(1):31-9.
68. Schitteck B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol* 2001;2(12):1133-7.
69. Schroder JM. Epithelial peptide antibiotics. *Biochem Pharmacol* 1999;57(2):121-34.
70. Seguchi T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T. Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res* 1996;288(8):442-6.
71. Soballe PW, Maloy WL, Myrnga ML, Jacob LS, Herlyn M. Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides. *Int J Cancer* 1995;60(2):280-4.
72. Steinberg DA, Lehrer RI. Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the "one-size-fits-all" theory. *Methods Mol Biol* 1997;78:169-86.
73. Steinstraesser L, Klein RD, Aminlari A, Fan MH, Khilanani V, Remick DG, et al. Protegrin-1 enhances bacterial killing in thermally injured skin. *Crit Care Med* 2001;29(7):1431-7.
74. Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Epplen JT, Hoffjan S. Two common loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose for early onset of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007;127(3):722-4.
75. Steven AC, Bisher ME, Roop DR, Steinert PM. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J Struct Biol* 1990;104(1-3):150-62.
76. Valore EV, Ganz T. Laboratory production of antimicrobial peptides in native conformation. *Methods Mol Biol* 1997;78:115-31.



77. Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V, Christophers E. Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248(3):904-9.
78. Wingens M, van Bergen BH, Hiemstra PS, Meis JF, van Vlijmen-Willems IM, Zeeuwen PL, et al. Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1998;111(6):996-1002.
79. Yeaman MR, Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003;55(1):27-55.
80. Zaiou M. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med* 2007;85(4):317-29.
81. Zhang D, Karunaratne S, Kessler M, Mahony D, Rothnagel JA. Characterization of mouse profilaggrin: evidence for nuclear engulfment and translocation of the profilaggrin B-domain during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 2002;119(4):905-12.
82. Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock RE, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):2921-7.

## 8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder, für die Überlassung des Themas, für die hervorragende Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Für die große Hilfsbereitschaft und zahlreichen Tips bei der Laborarbeit und die freundliche Atmosphäre möchte ich mich ganz herzlich bei Anke, Bente, Britta, Claudia M., Claudia N. Doris, Elvira, Eske, Felix, Graziella, Heilwig, Joachim, Jutta, Kerstin, Manfred, Marlis, Regine, Uli und Zhihong bedanken. Außerdem danke ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Hautklinik.

Jutta, Anke, Claudia und Britta danke ich für die Unterstützung bei den HPLC-Läufen.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Britta Hansmann, die mich im Verlauf meiner gesamten Doktorarbeit tatkräftig unterstützt hat. Liebe Britta, ich möchte mich dafür bedanken, dass Du mir sowohl während der experimentellen Phase als auch während des Verfassens dieser Arbeit immer wieder mit zahlreichen Anregungen und Ratschlägen, aber auch unterstützenden Worten weitergeholfen und somit einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hast. Du hast maßgeblich dazu beigetragen, dass ich mich von Beginn an im Labor richtig wohl und willkommen gefühlt habe. Ich danke Dir dafür, dass ich mich jederzeit an Dich wenden konnte und dabei stets auf ein offenes Gehör gestoßen bin. Dank Deiner Unterstützung habe ich vieles im Labor lernen können, von dem ich hoffentlich auch in Zukunft profitieren kann. Mit Deiner Begeisterung für die Wissenschaft hast Du auch mein Interesse an der Forschung weiter gestärkt. Für Deine ständige Diskussionsbereitschaft und Deine gewissenhaften Korrekturen möchte ich mich ebenfalls bedanken. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können!!

Meinem Kommilitonen und gutem Freund Christian Schulz möchte ich danken. Wir haben den interessanten, aber auch arbeitsintensiven Weg der Doktorarbeit zusammen beschritten. Christian, ich danke Dir für die Unterstützung im Labor und am Schreibtisch, für die vielen guten Ideen und Deine Diskussionsbereitschaft, aber auch den Spaß, den wir während und nach getaner Arbeit hatten. Ich bin froh, mit Dir einen zuverlässigen, hilfsbereiten „Doktorarbeitsverbündeten“ zu haben.

Außerdem möchte ich Sarah und Jonathan für den regen Informationsaustausch während der experimentellen Phase, aber auch während des Zusammenschreibens sowie die netten Stunden im Labor danken.

Meiner Freundin Johanna danke ich für die vielen schönen und entspannten Stunden nach getaner Arbeit. Mit vielen von Dir zubereiteten Leckereien am Abend, Massagen, aber auch Deinem großen Verständnis hast Du dazu beigetragen, dass ich trotz der intensiven Arbeit immer wieder Momente der Ruhe gefunden habe. Ich danke Dir dafür, dass Du alle meine nicht enden wollenden Ausführungen bezüglich dieser Arbeit, aber auch anderen wissenschaftlichen Themen immer interessiert verfolgt und mich jederzeit unterstützt hast.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken. Ich danke meinen Eltern, dass Sie mich immer bestmöglich unterstützt haben. Dank Euch konnte ich meinen großen Wunsch des Medizinstudiums und damit auch dieser Arbeit verwirklichen. Ich bin Euch dankbar, dass ich immer auf Euch zählen kann und bin glücklich über alles, was Ihr für mich getan habt. Ihr habt mir das beste Zuhause gegeben, das man sich vorstellen kann. Meiner Schwester und ihrem Freund Riccardo danke ich für die vielen lustigen Stunden und interessanten Unternehmungen.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name:	Dennis Karsch
Geburtsdatum:	01.01.1983
Geburtsort:	Eckernförde
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Werner Karsch Sigrid Karsch geb. Kursch

### Schulischer Werdegang:

1989-1993	Albert-Schweitzer-Grundschule Eckernförde
1993-2002	Jungmann-Gymnasium Eckernförde
Juni 2002	Abitur

### Zivildienst:

2002-2003	Domobil, ambulanter Pflegedienst, Eckernförde
-----------	---

### Studium:

2003-2009	Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Promotion:

Seit November 2006	Promotion bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. J.-M. Schröder an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel
--------------------	---

## 10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz, noch zum Teil an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Sie wurde - abgesehen von der unten genannten Teilpublikation - noch nicht veröffentlicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Kiel, den 22.02.2011

---

Dennis Karsch

Bisher erfolgte Teilpublikation:

Behrendt, F., Hartmann, J., Babian, S., Karsch, D., Schulz, C., Latendorf, T., Hansmann, B., Wu, Z., Schröder, J.-M., 2010. Profilaggrin constitutively provides a basal antimicrobial reservoir for the skin. J. Invest. Dermatol. 130 (S2), S32, Abstract 189.